

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I**  
**ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT**

**Doctorat en**  
**Biologie Structurale et Nanobiologie**

**Carmen GALIÁN BARRUECO**

Caractérisation de 2 transporteurs ABC  
("ATP-Binding Cassette") bactériens de fonction inconnue :  
YheI/YheH de *Bacillus subtilis* et Rv1747 de *Mycobacterium tuberculosis*

***Thèse dirigée par le Dr. Jean-Michel JAULT***

Soutenue le 19 décembre 2008 à Grenoble

**Composition du Jury**

Dr. Daniel BRETHES	Rapporteur
Dr. Elie DASSA	Rapporteur
Prof. Eva PEBAY-PEYROULA	Examineur
Dr. Daniel LEVY	Examineur
Dr. Jean-Michel JAULT	Directeur de thèse

Thèse réalisée à l'Institut de Biologie Structurale J.-P. Ebel (UMR 5075 UJF/CNRS/CEA) et au  
Laboratoire de Biophysique Moléculaire et Cellulaire (ancienne UMR 5090 UJF/CNRS/CEA)





## MERCI

à Jean-Michel, de son excellent encadrement, son enthousiasme scientifique, sa capacité à interpréter positivement les résultats, sa disponibilité illimitée, ses grandes qualités humaines, sa bonne humeur, ses encouragements quotidiens

à Daniel et à Elie, d'avoir accepté de juger ce travail de thèse  
à Eva, de bien vouloir présider le jury et examiner ce travail  
à Daniel, d'intégrer le jury et d'examiner ce travail

au Ministère Français de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, à l'Université Joseph Fourier, à l'ANR, au GFB et à la FEMS, du soutien financier

à Cristina, por haberme iniciado al proyecto YÉYÉ y haber compartido conmigo todo su saber, por sus cualidades humanas y su amistad, por tantos viernes a las 20h esperando que el lunes hubiera mejores resultados  
à Anne ΔE, de m'avoir appris tellement sur les protéines membranaires et sur la façon de « rechercher », d'avoir partagé quotidiennement nos doutes, nos espoirs et nos sourires  
à Anne-E, de son amitié, de sa force, de son soin quotidien aux JMJ's  
à Catherine, de sa sympathie, de son respect, de son optimisme  
à Johanna, de son sourire, de son énergie, de ses encouragements  
à Sandrine, d'avoir nuancé le mythe des boucles d'oreille et des colliers assortis  
à Saïda, à Marilia, à Ivan, à Cigdem, de m'avoir supportée en tant qu'encadrant  
à Matthieu, à Emilie et à Hien-Anh, de renouveler le sang des JMJ's  
aux anciens thésards de Jean-Michel, de leur travail sur BmrA qui a fortement inspiré et simplifié ce travail

à Iulia, ma fidèle compagne de bureau, de son amitié, de sa sensibilité, du partage quotidien  
à Richard, de sa sensibilité, de sa disponibilité sans faille  
à Jean, de ses questions illimitées, de sa naïveté consciente  
à Tof, de partager avec moi son enthousiasme pédagogique et ses réflexions toujours intéressantes  
à Julien, de son sourire qui nous manque  
à Isabelle et à Céline, de leur aide au quotidien avec un sourire comme devise  
à tous les membres du LPM et de l'ancien BMC, de l'opportunité de réaliser ce travail dans les meilleures conditions matérielles et humaines  
à Eva, de nous avoir accueillis à bras ouverts au sein du LPM

à Daniel, des longues discussions scientifiques pleines d'humour qui m'ont  
tellement appris, de la motivation pour améliorer les purifications, de  
partager avec moi tes questions et de ta patience face aux miennes  
à Aurélie, de ton investissement dans le projet des YéYé, de tes précisions précieuses  
à Manuela, de renouveler le dynamisme des ABCs à Paris

à l'équipe lyonnaise, Pierre, Fred, Rima, Attilio, Hélène, Sira, des discussions et bons moments  
à nos collaborateurs Virginie, Christoph et James, de leur aide et contributions

à Claudine et à Laurence, de leur exemple de gestion et de motivation pleines de couleurs  
et à toute l'équipe colorée, du magnifique travail accompli et du plaisir d'en faire partie  
aux constructivistes, du questionnement soulevé sur les façons d'enseigner, des  
discussions révélatrices, de relancer l'utopie pédagogique et didactique

à Aurore, de tant de dîners, de discussions, de passion  
artistique-littéraire, de gaufres partagés  
à Magali et à Walter, mes premiers amphitryons à Grenoble,  
de votre sympathie et tous ces moments passés ensemble  
à Guillaume, de son amitié et des soirées « Vin et France Culture »  
a los grasapardos (¿ podrán perdonar esta dolorosa generalizacion ?), a María, a Liva, a Marco,  
por la amistad incondicional a pesar del descuido por mi parte

a mis padres, Ramón y Lupe, sin los cuales este documento no habría podido nacer,  
por su educación, por tanto amor y tanta esperanza puesta en mí  
a los CGCG, por sus ánimos, su empatía, su alegría, por ser mucho más que dos  
a los Atienza Badel, por su acogida, su respeto, su cariño  
a Ricardo, sustento y motivación cotidianos, por el placer de compartir también la tesis doctoral

## Résumé de la Thèse

L'émergence du phénotype MDR (« multidrug resistance ») des cellules cancéreuses est souvent corrélée à la surexpression de protéines membranaires appartenant à la superfamille ABC (« ATP-binding cassette »). Ces protéines couplent l'hydrolyse de l'ATP au transport d'agents chimiothérapeutiques vers l'extérieur des cellules. Chez les bactéries, des transporteurs homologues ont été impliqués dans certains cas de résistance aux antibiotiques.

Deux nouveaux transporteurs ABC bactériens, Rv1747 de *Mycobacterium tuberculosis* et Yhel/YheH de *Bacillus subtilis*, potentiellement impliqués dans la résistance aux antibiotiques, ont été étudiés ici en réalisant une expression hétérologue chez *Escherichia coli* et en isolant des vésicules de membrane inversées. Ce système s'est avéré inapproprié pour l'étude du transporteur Rv1747, à cause vraisemblablement des différences entre *E. coli* et *M. tuberculosis* dans l'usage des codons. En revanche, nous avons obtenu un niveau important de surexpression de Yhel/YheH qui nous a permis de caractériser son activité de transport et d'hydrolyse de l'ATP. Nous avons ainsi montré que les deux protéines, Yhel et YheH, s'associent pour former un exportateur hétérodimérique capable de transporter de multiples drogues, et que le rôle des deux sous-unités n'est pas identique dans le mécanisme catalytique du transporteur. Enfin, nous avons réussi à purifier le transporteur Yhel/YheH avec un rendement élevé et dans un état fonctionnel stable, permettant d'approfondir sa caractérisation biochimique ainsi que d'obtenir des cristaux bidimensionnels pour une étude structurale par microscopie électronique.

**Mots clés :** transporteurs ABC, protéines membranaires, résistance à de multiples drogues, résistance aux antibiotiques, détergents, protéoliposomes, mécanisme catalytique, hydrolyse de l'ATP

## Titre de la Thèse en anglais

Characterization of 2 bacterial ABC ("ATP-Binding Cassette") transporters of unknown function : Yhel/YheH from *Bacillus subtilis* and Rv1747 from *Mycobacterium tuberculosis*

## Résumé de la Thèse en anglais

The multidrug resistance (MDR) phenotype of cancer cells is often associated with overexpression of membrane proteins which belong to the large superfamily of ABC ("ATP-binding cassette") transporters. These proteins couple ATP hydrolysis to the efflux of chemotherapeutic drugs. Homologous transporters from bacteria have been involved in antibiotic resistance.

Two new bacterial ABC transporters, Rv1747 from *Mycobacterium tuberculosis* and Yhel/YheH from *Bacillus subtilis*, putatively involved in antibiotic resistance, have been studied here after heterologous expression in *Escherichia coli* and isolation of inverted membrane vesicles. This system has proved not to be useful for the study of Rv1747, due probably to codon usage differences between *E. coli* and *M. tuberculosis*. By contrast, we reached a high expression level of Yhel/YheH which allowed the characterization of its transport and ATP hydrolysis activities. We thus showed that these two proteins associate to form a heterodimeric transporter able to efflux several structurally unrelated drugs, and that the two subunits play different roles in the catalytic mechanism. Finally, we managed to purify Yhel/YheH in high yield, in a functional and stable state, which allowed us to extend its biochemical characterization and to obtain 2D crystals for structural studies by electron microscopy.

**Mots clés en anglais :** ABC transporters, membrane proteins, multidrug resistance, antibiotic resistance, detergents, proteoliposomes, catalytic mechanism, ATP hydrolysis



## TABLE DES MATIERES

<b>Résumé et mots clés</b> .....	5
<b>Table des matières</b> .....	7
<b>Liste des figures</b> .....	11
<b>Liste des tableaux</b> .....	13
<b>Abréviations</b> .....	14
<b>INTRODUCTION</b> .....	17
<b>RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	21
<b>Les transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette »)</b> .....	23
<i>La diversité des transporteurs ABC</i> .....	23
<i>Les domaines nucléotidiques</i> .....	25
<i>Les domaines transmembranaires : leçons des structures 3D</i> .....	28
<i>Questions ouvertes sur le mécanisme fonctionnel des transporteurs ABC</i> .....	31
Couplage entre cycle hydrolytique et cycle de transport.....	31
La phosphorylation des transporteurs ABC .....	34
Mécanisme catalytique d'hydrolyse.....	34
<b>La Résistance à de Multiples Drogues (MDR)</b> .....	36
<i>Le phénomène MDR et les transporteurs ABC humains</i> .....	36
<i>La résistance à de multiples antibiotiques et les pompes à efflux bactériennes</i> .....	38
<i>Transporteurs ABC MDR chez les procaryotes</i> .....	41
<i>Les mystères des transporteurs de multiples drogues</i> .....	45
La reconnaissance de multiples drogues dévoilée ? .....	46
D'autres rôles physiologiques pour les transporteurs de multiples drogues ? .....	49
<b>La bactérie <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	51
<i>La sporulation</i> .....	52
<i>Les systèmes de transduction à deux composants</i> .....	53
<i>La réponse stringente</i> .....	55
<i>Les transporteurs de drogues chez <i>Bacillus subtilis</i></i> .....	57
<i>Les transporteurs ABC de drogues chez <i>Bacillus subtilis</i></i> .....	58
<b>Le transporteur YheI/YheH de <i>B. subtilis</i></b> .....	61
<i>YheI/YheH et le stress cellulaire</i> .....	62
<i>YheI/YheH et la sporulation</i> .....	64

<b>La bactérie <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> .....	65
<i>La paroi cellulaire de M. tuberculosis</i> .....	67
<i>Les sérine/thréonine protéine kinases chez M. tuberculosis</i> .....	68
<i>Les domaines FHA</i> .....	70
<i>Les transporteurs de drogues chez M. tuberculosis</i> .....	73
<i>Les transporteurs ABC de drogues chez M. tuberculosis</i> .....	74
<b>Le transporteur Rv1747 de <i>M. tuberculosis</i></b> .....	76
<i>La phosphorylation de Rv1747 par PknF</i> .....	78
<i>Rôle physiologique de Rv1747 et PknF</i> .....	79
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	81
<b>Biologie Moléculaire</b> .....	83
Souches bactériennes .....	83
Conditions de culture .....	83
<i>Techniques de Biologie Moléculaire</i> .....	84
Préparation et transformation de bactéries compétentes .....	84
Préparation d'ADN plasmidique .....	84
Electrophorèse des fragments d'ADN .....	85
Restriction et ligation .....	86
Amplification d'ADN par PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) .....	86
<i>Constructions</i> .....	87
Oligonucléotides .....	87
Plasmides utilisés .....	88
Clonages et sous-clonages .....	88
Mutagenèse dirigée .....	89
Délétion des gènes <i>yheI</i> et <i>yheH</i> .....	91
<b>Préparation de protéines recombinantes</b> .....	92
<i>Surproduction analytique</i> .....	92
Expression hétérologue chez <i>Escherichia coli</i> .....	92
Expression en système acellulaire .....	93
Tests de solubilité et d'adressage à la membrane .....	93
<i>Surproduction préparative</i> .....	94
Préparation de vésicules de membrane inversées .....	94
Purification de YheI/YheH .....	95
Concentration des protéines .....	96
<i>Dosage des protéines</i> .....	96
Méthode modifiée de Lowry .....	96
Dosage de Bradford .....	97
<i>Détection des protéines</i> .....	98

Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) .....	98
Détection de protéines par immunorévélation.....	99
<i>Chromatographie d'exclusion de taille</i> .....	100
<i>Reconstitution des protéines en liposomes</i> .....	101
<b>Méthodes d'étude fonctionnelle</b> .....	104
<i>Mesures d'activité ATPase</i> .....	104
Préparation des solutions concentrées d'ATP et d'orthovanadate .....	104
Dosage de l'ADP produit par la réaction .....	104
Dosage du phosphate inorganique produit par la réaction .....	105
<i>Mesures de transport de drogues</i> .....	106
Transport de drogues dans des cellules .....	107
Transport de drogues par des vésicules de membrane inversées .....	107
<i>Mesures de sensibilité aux antibiotiques</i> .....	109
Méthode de diffusion en milieu solide .....	109
Méthode de dilution en milieu liquide .....	109
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	111
<b>L'expression recombinante de Rv1747</b> .....	113
<i>L'hypothèse de la dégradation protéolytique</i> .....	114
<i>L'hypothèse de l'arrêt traductionnel</i> .....	118
<b>Etude de Rv1747 dans des vésicules membranaires</b> .....	121
<b>Yhel/YheH : un transporteur ABC hétérodimérique</b> .....	125
<i>Le chevauchement génique</i> .....	125
<i>Expression hétérologue de Yhel et YheH chez E. coli</i> .....	128
<i>Yhel et YheH forment « une ATPase » hétérodimérique</i> .....	129
<i>Yhel et YheH interagissent physiquement</i> .....	130
<b>Yhel/YheH : un transporteur ABC de multiples drogues</b> .....	132
<i>Mesures de transport dans des vésicules de membrane inversées (IMVs)</i> .....	132
<i>Mesures de transport dans des cellules</i> .....	135
<b>Quelle fonction physiologique pour Yhel/YheH ?</b> .....	137
<i>Yhel/YheH et les antibiotiques</i> .....	137
<i>L'atténuation transcriptionnelle : implication des antibiotiques ?</i> .....	142
<i>Yhel/YheH et le stress cellulaire</i> .....	146
<i>Yhel/YheH et la sporulation</i> .....	148
<b>Purification de l'hétérodimère Yhel/YheH</b> .....	150
<i>Le choix du détergent</i> .....	151
<i>Activité, homogénéité et stabilité de Yhel/YheH purifié</i> .....	154

Analyse par chromatographie d'exclusion de taille .....	155
Etude de l'activité ATPase.....	156
Analyse par ultracentrifugation analytique .....	157
<i>Cristallisation de Yhel/YheH</i> .....	159
<i>Purification séparée des sous-unités Yhel et YheH</i> .....	161
<b>Reconstitution du transporteur Yhel/YheH</b> .....	163
<i>Le choix des lipides</i> .....	163
<i>Le choix du détergent</i> .....	165
<i>Rapport lipide:protéine, détergent:lipide et orientation des protéines</i> .....	167
<i>Activité ATPase de Yhel/YheH reconstitué</i> .....	169
Bilan des différentes mesures .....	169
Constantes cinétiques de l'hydrolyse de l'ATP par Yhel/YheH.....	170
<b>Etude des mutants catalytiques de Yhel/YheH</b> .....	172
<i>Mutagenèse de la lysine conservée du motif A de Walker</i> .....	173
<i>Mutagenèse de l'histidine conservée de l'H-loop</i> .....	176
<i>Mutagenèse du carboxylate « catalytique »</i> .....	178
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b> .....	181
<b>ANNEXES</b> .....	185
<b>Annexe A : Différentes familles d'antibiotiques</b> .....	187
<b>Annexe B : Le traitement de la tuberculose</b> .....	193
<b>Annexe C : Antiseptiques et cations quaternaires</b> .....	195
<b>Annexe D : Colorants fluorescents</b> .....	196
<b>Liste des structures chimiques détaillées dans les Annexes A-D</b> .....	197
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	199
<b><i>Communications et Publications</i></b> .....	231



## LISTE DES FIGURES

1. Diversité des transporteurs ABC .....	24
2. Structure primaire et secondaire des domaines nucléotidiques .....	25-26
3. Structure cristallographique du domaine nucléotidique du transporteur d'hæmolysine HlyB, formant un dimère en présence d'ATP/Mg <sup>2+</sup> .....	27
4. Structures cristallographiques de 2 transporteurs ABC .....	31
5. Modèle <i>ATP-switch</i> proposé pour expliquer le cycle de transport/hydrolyse d'un transporteur ABC .....	33
6. Schéma des deux mécanismes catalytiques proposés pour l'hydrolyse de l'ATP par les protéines ABC .....	35
7. Topologie prédite pour ABCC1, ABCB1 et ABCG2 .....	37
8. Représentation schématique des principales familles de transporteurs MDR secondaires chez les procaryotes .....	40
9. Position des ligands rhodamine-6-G et éthidium dans le site de liaison du régulateur transcriptionnel QacR de <i>S. aureus</i> .....	46
10. Section de la structure du transporteur EmrD montrant la cavité hydrophobe interne. Structure du transporteur Sav1866 montrant la cavité centrale colorée en fonction du potentiel électrostatique de surface .....	48
11. Architecture d'une colonie de la souche sauvage <i>B. subtilis</i> NCIB3610, montrant la formation d'un biofilm .....	51
12. Les étapes morphologiques de la sporulation .....	52
13. Paradigme de la transduction du signal par les systèmes à deux composants .....	53
14. Représentation schématique du réseau de signalisation et modulation qui régule l'entrée en sporulation de <i>B. subtilis</i> .....	54
15. Représentation schématique de la réponse stringente bactérienne.....	56
16. Organisation de l'opéron <i>yhel/yheH</i> chez <i>B. subtilis</i> et topologie prédite des protéines Yhel et YheH .....	61
17. Schéma récapitulatif des processus physiologiques de <i>Bacillus subtilis</i> faisant intervenir Yhel/YheH.....	63
18. Les étapes de l'infection par <i>M. tuberculosis</i> .....	65
19. Représentation schématique de la paroi cellulaire des mycobactéries .....	67
20. Structures chimiques des acides mycoliques de <i>M. tuberculosis</i> .....	68
21. Représentation schématique de la topologie et la composition modulaire des sérine/thréonine protéine kinases de <i>M. tuberculosis</i> .....	69
22. Structure tridimensionnelle du domaine FHA-1 de Rad53 en complexe avec un phosphopeptide.....	71
23. Réseau d'interactions entre protéines contenant des domaines FHA et STPKs de <i>M. tuberculosis</i> .....	72
24. Domaines structuraux du transporteur ABC Rv1747 .....	76
25. Alignement des régions génomiques de <i>rv1747</i> et de ses homologues .....	78
26. Expression de Rv1747 dans différentes souches. Effet du milieu de culture .....	114

27. Expression de Rv1747 dans différentes souches dérivées de BL21(DE3). Expression <i>in vitro</i> de Rv1747. Expression du NBD de Rv1747 en présence des chaperonnes GroES/GroEL et de la thiorédoxine.....	116
28. Distribution des codons rares contigus dans le gène <i>rv1747</i> .....	118
29. Vésicules de membrane inversées contenant Rv1747.....	121
30. Transport du Hoechst 33342 par des vésicules de membrane inversées contenant Rv1747 de type sauvage et les mutants K358A et E479Q.....	123
31. Comparaison des régions 5' non traduites de <i>yheI</i> et <i>yheH</i> et comparaison avec le consensus pour <i>B. subtilis</i> .....	125
32. Alignement des régions génomiques de différentes espèces de <i>Bacillus</i> contenant les orthologues de <i>yheI/yheH</i> .....	127
33. Vésicules de membrane inversées (IMVs) obtenues à partir d' <i>E. coli</i> BL21(DE3) surexprimant YheI et/ou YheH. Activité ATPase des IMVs contenant YheI, YheH ou YheI+YheH.....	129
34. Transport du Hoechst 33342 par des vésicules de membrane inversées contenant YheI et/ou YheH.....	133
35. Transport de la doxorubicine par des vésicules de membrane inversées contenant YheI/YheH. Effet de la température sur la vitesse de transport.....	133
36. Transport de la mitoxantrone par des vésicules de membrane inversées contenant YheI/YheH. Accumulation de BCECF dans des IMVs contenant YheI/YheH.....	134
37. Incorporation de Hoechst 33342 et d'éthidium dans <i>E. coli</i> KAM32 exprimant YheI/YheH sauvage ou le double mutant YheI K377A/YheH K469A.....	136
38. Région génique de <i>B. subtilis</i> montrant l'emplacement de <i>yheJ</i> par rapport aux gènes <i>yheI/yheH</i> , ainsi que la position des promoteurs putatifs de type $\sigma^A$ et $\sigma^W$ .....	143
39. Régulation de l'opéron tryptophane par atténuation de la transcription.....	144
40. Structure d'atténuation de transcription prédite pour <i>yheI/yheH</i> .....	144
41. Schéma récapitulatif des processus physiologiques de <i>Bacillus subtilis</i> faisant intervenir YheI/YheH, complété à partir de la figure 17.....	149
42. Chromatographie d'affinité sur $Ni^{2+}$ -agarose de YheI/YheH.....	151
43. Solubilisation de YheI/YheH dans les membranes d' <i>E. coli</i> avec différents détergents.....	152
44. Purification de YheI/YheH dans différents détergents.....	153
45. Effet de la durée d'induction sur la purification de YheI/YheH.....	155
46. Stimulation de l'activité ATPase de YheI/YheH par le substrat Hoechst 33342.....	157
47. Analyse de l'état d'oligomérisation et de l'activité ATPase de YheI/YheH purifié : étude de sa stabilité à 4°C.....	158
48. Cristallisation de YheI/YheH en deux dimensions.....	160
49. Purification séparée de YheI et YheH.....	162
50. Reconstitution de YheI/YheH avec différents lipides.....	164
51. Reconstitution de YheI/YheH en PC/PA (9:1 w/w) solubilisés dans différents détergents.....	166
52. Reconstitution de YheI/YheH à différents rapports lipide:protéine.....	167
53. Détermination des constantes cinétiques de YheI/YheH purifié et reconstitué.....	171
54. Représentation schématique du dimère des NBDs de YheI et de YheH contenant une molécule d'ATP dans chaque site composite.....	173
55. Transport de drogues par les mutants catalytiques de YheI/YheH.....	175
56. Analyse des mutants catalytiques de YheI/YheH purifiés.....	177

## LISTE DES TABLEAUX

1. Structures cristallographiques disponibles de transporteurs ABC entiers .....	30
2. Transporteurs ABC dans des actinomycètes producteurs d'antibiotiques .....	41
3. Protéines NBD <sub>2</sub> de la famille ARE caractérisées dans des bactéries Gram+ non productrices d'antibiotiques .....	42
4. Transporteurs ABC bactériens impliqués dans l'efflux de multiples drogues caractérisés au niveau moléculaire et/ou cellulaire .....	44
5. Transporteurs MDR de <i>B. subtilis</i> caractérisés (autres que les transporteurs ABC).....	57
6. Comparaison de la composition en protéines ABC de 3 génomes bactériens.....	59
7. Récapitulatif des données expérimentales disponibles concernant les STPKs de <i>M. tuberculosis</i> .....	70
8. Transporteurs de drogues putatifs de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>M. smegmatis</i> ayant été étudiés .....	75
9. Homologues proches du transporteur Rv1747 .....	77
10. Orthologues de Yhel/YheH dans différentes bactéries.....	127
11. Induction de la transcription de <i>yhel/yheH</i> <i>in vivo</i> par des concentrations subinhibitrices d'antibiotique .....	138
12. Sensibilité de <i>B. subtilis</i> et <i>E. coli</i> à différents antibiotiques en présence et absence de Yhel/YheH .....	140
13. Rendement obtenu pour les purifications dans différents détergents et activité ATPase mesurée pour ces différentes préparations de Yhel/YheH .....	152
14. Activité ATPase en détergent d'exportateurs ABC purifiés.....	156
15. Motifs conservés des domaines nucléotidiques : comparaison des séquences de différents transporteurs ABC.....	172

## ABREVIATIONS

7AAD .....	7-Amino-Actinomycine D
ABC .....	<i>ATP-Binding Bassette</i>
ABCP .....	transporteur ABC de Placenta
Acr .....	<i>ACriflavine Resistance</i>
ADN .....	Acide DésoxyriboNucléique
ADP .....	Adénosine-5'-DiPhosphate
ALD .....	AdrénoleucoDystrophie
AMPPNP .....	Adénosine-5'-( $\beta$ - $\gamma$ -imido)triphosphate
APS .....	Ammonium PerSulfate
ARN .....	Acide RiboNucléique
ARNm .....	Acide RiboNucléique Messenger
ARNt .....	Acide RiboNucléique de Transfert
ART .....	résistance aux Antibiotiques, Régulation, Traduction
ATP .....	Adénosine-5'-TriPhosphate
AUC .....	<i>Analytical UltraCentrifugation</i>
BCECF .....	2',7'- Bis-2-(CarboxyEthyl)-5,6-Carboxy-Fluorescéine
BCRP .....	<i>Breast Cancer Resistance Protein</i>
BLAST .....	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bmr .....	<i>Bacillus Multidrug Resistance</i>
B-PER .....	<i>Bacterial-Protein Extraction Reagent</i>
Brij .....	polyoxyethylene-glycol-ether
BSA .....	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CBS .....	<i>Cystathione-Beta-Synthase</i>
CFTR .....	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
Chol .....	Cholestérol
CL .....	CardioLipine
Clustal .....	<i>Cluster Alignment</i>
CMR .....	<i>Comprehensive Microbial Resource</i>
CTAB .....	Cetyl TrimethylAmmonium Bromide
Da .....	Dalton
DAPI .....	4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole
DDM .....	n-DoDécyl- $\beta$ -Maltoside
DDT .....	Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane
DM .....	DécylMaltoside
DO .....	Densité Optique
DOC .....	DeOxyCholate
DOPC .....	DiOléoylPhosphatidylCholine
DOPG .....	DiOléoylPhosphatidylGlycérol
DOTM .....	DOdécylThioMaltoside
DTT .....	DiThioThrétol
EDTA .....	acide Ethylène Diamine TetraAcétique
EF .....	Facteur d'Elongation
Emr .....	<i>Escherichia coli Multidrug Resistance</i>
$\epsilon$ .....	Coefficient d'Extinction
FAB .....	<i>Fatty Acid Biosynthesis</i>

FC .....	Fos-Choline
FHA .....	<i>ForkHead-Associated</i>
GPL .....	GlycoPeptidoLipide
GST .....	Glutathion-S-Transférase
GTP .....	Guanosine-5'-TriPhosphate
Hecameg .....	6-O-(N-HEptylCArbamoyl)-MEthyl- $\alpha$ -D-Glucopyranoside
Hepes .....	Acide 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonique
HES .....	Hepes EDTA Saccharose
His <sub>6</sub> .....	hexahistidine
HIV .....	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
Hly .....	hæmolysine
Hoechst 33342 .....	2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole
HRP .....	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
IDA.....	<i>IminoDiacetic Acid</i>
IMP .....	Iosine-5'-MonoPhosphate
IPTG .....	Isopropyl-Beta-Thio-Galactoside
kDa .....	kiloDalton
Kin .....	Kinase
K <sub>M</sub> .....	Constante de Michaelis-Menten
LB .....	Luria-Bertani
LDAO .....	LaurylDiméthylAminoOxide
LDH .....	Lactate DésHydrogénase
Lmr .....	<i>Lactococcus Multidrug Resistance</i>
LOS .....	LipoOligoSaccharide
LPG .....	LysoPhosphatidylGlycérol
LPR.....	<i>Lipid:Protein Ratio</i>
MATE.....	<i>Multidrug And Toxic compound Extrusion</i>
MBP .....	<i>Myelin Basic Protein</i>
MFS .....	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MIC .....	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
MLS .....	Macrolides Lincosamides Streptogramines
MRP.....	<i>Multidrug Resistance-associated Protein</i>
Msb.....	<i>Multicopy Suppressor of htrB</i>
M <sub>w</sub> .....	<i>Molecular Weight</i>
MXR.....	<i>Mitoxantrone Resistance protein</i>
NAD(H) .....	Nicotinamide Adénine Dinucléotide sous forme oxydée (réduite)
NBD .....	<i>Nucleotide Binding Domain</i>
NTP .....	Nucléotide-5'-TriPhosphate
OG .....	OctylGlucoside
Omp.....	<i>Outer Membrane Protein</i>
OMS .....	Organisation Mondiale de la Santé
OTG.....	OctylThioGlucoside
o-van.....	ortho-vanadate
PA.....	<i>Phosphatidic Acid</i>
PAGE.....	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PASTA.....	<i>Penicillin-binding protein And Serine/Threonine kinase Associated domain</i>
PC.....	PhosphatidylCholine
PCR .....	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB .....	<i>Protein Data Bank</i>
PDR .....	<i>Pleiotropic Drug Resistance</i>

PDRE.....	<i>Pleiotropic Drug resistance Response Element</i>
PE.....	PhosphatidylEthanolamine
PEP.....	PhosphoEnolPyruvate
Pfu.....	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PG.....	PhosphatidylGlycérol
Pi.....	Phosphate Inorganique
PK.....	Pyruvate Kinase
Pkn.....	Protéine KiNase
P-loop.....	<i>Phosphate binding loop</i>
PMSF.....	<i>PhenylMethaneSulphonylFluoride</i>
(p)ppGpp.....	Guanosine (penta) tetraphosphate
PVA.....	PolyVinylAlcohol
PVDF.....	PolyVinylidèneFluoride
Rbg.....	<i>Ribosome biogenesis</i>
RBS.....	<i>Ribosome Binding Site</i>
RND.....	<i>Resistance-Nodulation-cell Division</i>
R <sub>s</sub> .....	Rayon de Stokes
SBP.....	<i>Substrate Binding Protein</i>
SDR.....	<i>Structurally Diverse Region</i>
SDS.....	Sodium DodécylSulfate
SEC.....	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SH3.....	<i>Src-Homology 3</i>
SIDA.....	Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SMR.....	<i>Small Multidrug Resistance</i>
Spo.....	Sporulation
SR.....	Reticulum Sarcoplasmique
STPK.....	Sérine/Thréonine Protéine Kinase
SUR.....	<i>SulfonylUrea Receptor</i>
TAE.....	Tris Acetate EDTA
TAP.....	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
TB (1).....	TurboBroth™
TB (2).....	TuBerculose
TCA.....	acide TriChloroAcétique
TEMED.....	N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine
TM.....	domaine transmembranaire
TMD.....	domaine transmembranaire
TMR.....	TétraMéthylRosamine
TPA.....	TétraPhénylArsonium
TPP.....	TétraPhénylPhosphonium
Tris.....	trishydroxyméthylaminométhane
Triton X-100.....	polyethylene glycol tert-octylphenyl ether
Trp.....	tryptophane
UCB.....	Urea Cracking Buffer
UDM.....	n-UnDécyl-β-Maltoside
ULB.....	Urea Loading Buffer
UV.....	UltraViolet
V <sub>max</sub> .....	Vitesse maximale
WW.....	domaine d'interaction protéine-protéine avec 2 tryptophanes conservés
XDR.....	<i>eXtensive Multidrug Resistance</i>

# INTRODUCTION







Le phénomène de la résistance à de multiples drogues ou MDR, découvert chez les cellules cancéreuses humaines, s'est avéré également pertinent chez les bactéries. En effet, la résistance croisée aux antibiotiques représente aujourd'hui un des défis majeurs de santé publique. Comme chez l'homme, des pompes à efflux peuvent donner lieu à des phénotypes de résistance croisée chez la bactérie. Ces transporteurs sont notamment capables de prendre en charge des xénobiotiques de structure et composition chimique très différentes et de les expulser hors de la cellule. Alors que les transporteurs secondaires étaient considérés jusqu'à présent comme les pompes principalement responsables des phénotypes MDR chez les bactéries, des études récentes sur au moins trois espèces bactériennes dévoilent un rôle également fondamental pour les transporteurs de la famille ABC (« ATP-Binding Cassette »).

Le séquençage de génomes bactériens révèle la présence d'un nombre très important de transporteurs putatifs de multiples drogues, dépassant la trentaine chez certaines espèces. Mais des études fonctionnelles systématiques montrent que seulement une partie de ces transporteurs putatifs sont en effet capables de conférer une résistance à la bactérie. D'autres rôles commencent à émerger pour certains de ces transporteurs, tels que la colonisation de niches écologiques ou la pathogénicité. Ces observations soulignent l'importance de l'étude fonctionnelle de ces transporteurs MDR putatifs pour éclaircir leur rôle physiologique au sein des cellules. D'un autre côté, l'étude de ces transporteurs peut contribuer à la compréhension moléculaire du phénomène de la reconnaissance de multiples drogues, qui représente un vrai défi allant à l'encontre du dogme « clef - serrure » comme explication de la spécificité d'une protéine pour son ligand.

Notre laboratoire s'est attaché depuis plusieurs années à l'étude de transporteurs ABC bactériens potentiellement impliqués dans l'efflux de multiples drogues. Ainsi, la protéine BmrA de *Bacillus subtilis* a été explorée en détail. Sa capacité à effluer des drogues a été confirmée, s'avérant être semblable à celle mise en évidence pour la glycoprotéine-P humaine. De même, ce transporteur a été purifié et sa caractérisation d'un point de vue fonctionnel et structural continue à être approfondie aujourd'hui.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux autres transporteurs ABC MDR putatifs bactériens : Rv1747 de *Mycobacterium tuberculosis* et Yhel/YheH de *Bacillus subtilis*.

En amont de cette thèse, un travail en collaboration avec le Dr. Virginie Molle (IBCP, Lyon) avait permis de mettre en évidence la phosphorylation du domaine nucléotidique de Rv1747 par une sérine/thréonine protéine kinase de *M. tuberculosis*. Le but poursuivi au cours de ce doctorat était de préciser et d'étendre à la protéine entière les conclusions de cette étude initiale et de répondre notamment à la question du substrat de Rv1747. Pour cela, la surexpression du transporteur entier a été réalisée chez *Escherichia coli*, système hétérologue qui s'était avéré très adapté à l'expression de BmrA. Malgré de nombreux efforts d'optimisation, un problème vraisemblablement d'arrêts traductionnels a limité notre étude et une réflexion est en cours sur la stratégie d'expression à adopter.

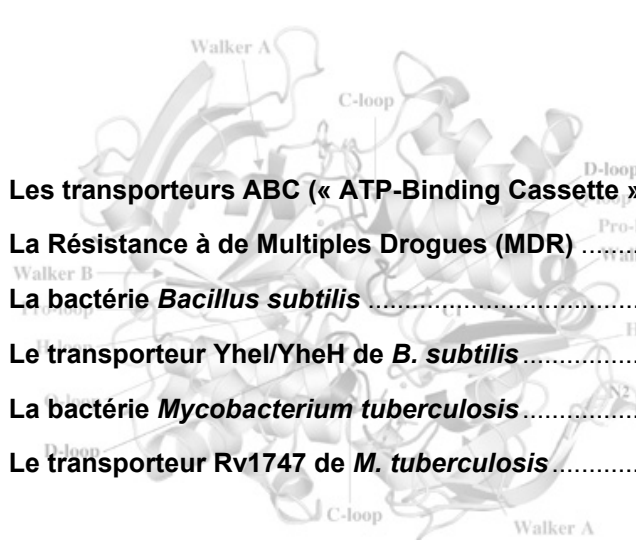
En revanche, ce système d'expression a été très favorable à la surproduction du transporteur Yhel/YheH de *B. subtilis* ce qui nous a permis d'entreprendre sa caractérisation. En préparant des vésicules de membranes inversées fortement enrichies en Yhel et YheH, nous avons pu montrer que ces deux protéines forment ensemble un hétérodimère fonctionnel, et identifié quatre drogues différentes qui sont transportées par Yhel/YheH, confirmant de cette manière la prédiction de transporteur de multiples drogues pour cette protéine.

Nous avons également cherché à étudier cette activité de transport *in vivo*, mais nos résultats n'ont pas permis de conclure quant au rôle de Yhel/YheH dans la résistance de *B. subtilis* à de multiples drogues. Par contre, en collaboration avec le Dr. C. Freiberg (Karlsruhe, Allemagne), nous avons mis en évidence une forte induction de l'expression de *yhel/yheH* en présence d'un nombre élevé d'antibiotiques, ciblant principalement le ribosome. La signification de cette induction reste encore à élucider.

Grâce au rendement élevé d'expression fonctionnelle de Yhel/YheH, la purification du transporteur était envisageable de façon à pouvoir réaliser des études à l'échelle moléculaire. Nous sommes parvenus à optimiser les conditions de purification et atteint un rendement supérieur à 10 mg de protéine par litre de culture. La protéine purifiée est active et remarquablement stable, indiquant que l'association des deux sous-unités est préservée à l'issue de la purification. Ceci a notamment permis au groupe du Dr. Daniel Lévy (Institut Curie, Paris) avec qui nous collaborons, de cristalliser la protéine en deux dimensions.

Enfin, nous avons étudié le rôle des domaines nucléotidiques de Yhel et YheH dans le fonctionnement du transporteur, en ciblant par mutagenèse dirigée des résidus conservés potentiellement impliqués dans la liaison et/ou l'hydrolyse de l'ATP. Nos résultats mettent en évidence la non équivalence des deux domaines nucléotidiques de ce transporteur hétérodimérique et font apparaître un rôle structural inattendu pour un des résidus mutés.

# RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES



<b>Les transporteurs ABC (« ATP-Binding Cassette »)</b> .....	23
<b>La Résistance à de Multiples Drogues (MDR)</b> .....	36
<b>La bactérie <i>Bacillus subtilis</i></b> .....	51
<b>Le transporteur YheI/YheH de <i>B. subtilis</i></b> .....	61
<b>La bactérie <i>Mycobacterium tuberculosis</i></b> .....	65
<b>Le transporteur Rv1747 de <i>M. tuberculosis</i></b> .....	76



## LES TRANSPORTEURS ABC (« ATP-BINDING CASSETTE »)

### *La diversité des transporteurs ABC*

Les transporteurs ABC (pour **ATP-Binding Cassette**) sont présents dans les trois domaines d'organismes vivants (eubactéries, archéobactéries et eucaryotes ; Higgins 1992; Saurin *et al.* 1999) et constituent vraisemblablement la superfamille de protéines la plus vaste. L'analyse du génome d'*Escherichia coli* a révélé que les transporteurs ABC constituent la superfamille de protéines paralogues la plus importante en membres (Blattner *et al.* 1997). Le séquençage progressif de nouveaux génomes a permis d'élargir cette observation à d'autres bactéries (Tomii *et al.* 1998). 48 gènes ABC ont été identifiés chez l'homme, ayant été classés en 8 sous-familles nommées ABCA-G (Dean *et al.* 2001).

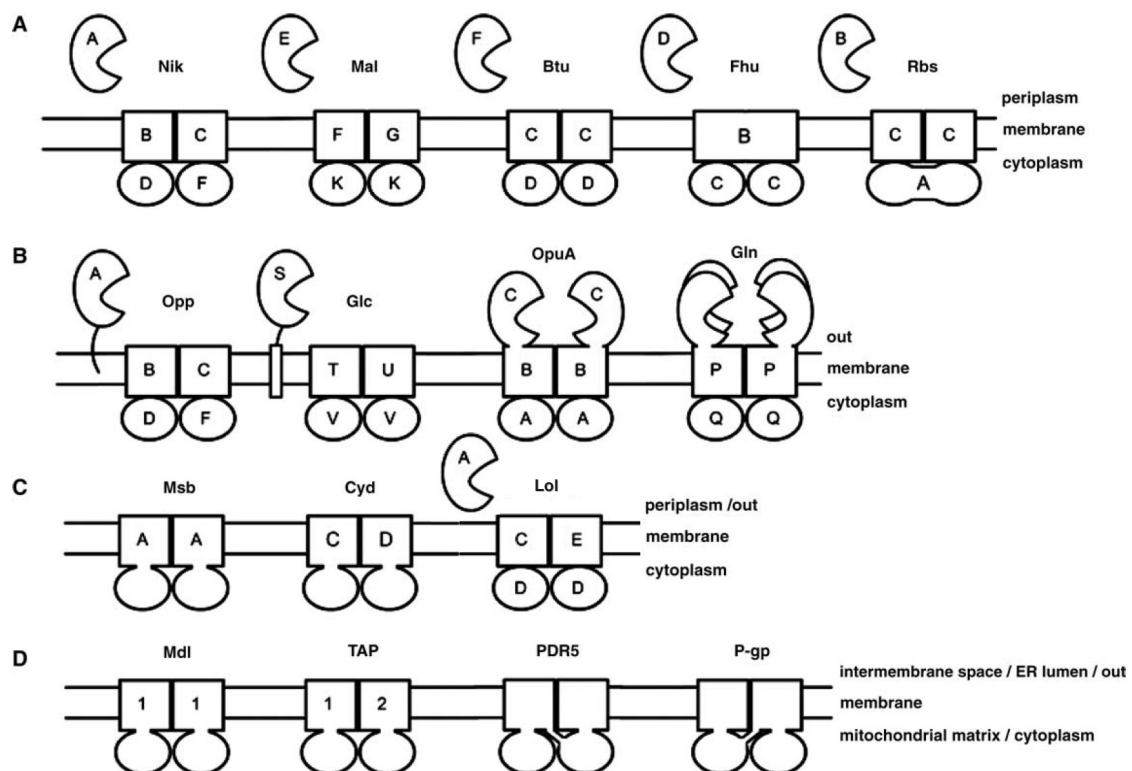
Les transporteurs ABC appartiennent à la famille des *nucleotide triphosphate hydrolases* (NTPases) à *P-loop* (*phosphate binding loop*, motif décrit dans la section suivante). Ils catalysent l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  de l'ATP, avec intervention dans le site actif d'une molécule d'eau et d'un cofacteur métallique divalent. Le domaine responsable de cette activité catalytique (appelé *Nucleotide Binding Domain* ou NBD) est la marque distinctive des protéines ABC, d'où le nom de la superfamille (ABC pour **ATP-Binding Cassette**). Il s'agit d'un domaine hautement conservé, constitué typiquement de 200 acides aminés contenant, outre les motifs Walker A et Walker B communs à d'autres ATPases à *P-loop* (Walker *et al.* 1982), un motif caractéristique appelé « signature ABC » (séquence consensus LSGGQ, cf. fig. 2 et section suivante ; Higgins *et al.* 1988; Ames *et al.* 1990).

Les protéines ABC sont des transporteurs primaires : l'énergie dégagée par la liaison et l'hydrolyse d'ATP est couplée au transport unidirectionnel de substrats à travers la membrane. Les transporteurs ABC sont composés typiquement de quatre modules, deux cytoplasmiques et deux transmembranaires, présents dans des chaînes polypeptidiques individuelles ou fusionnés au sein de deux voire d'un seul polypeptide multifonctionnel (cf. fig. 1). Les domaines cytoplasmiques correspondent aux NBDs décrits plus haut, responsables de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP. Les domaines transmembranaires (TMD) constituent le site de liaison et translocation du substrat.

A partir du noyau minimal de quatre domaines, une grande diversité d'architecture et de topologie sont retrouvées parmi les transporteurs ABC (cf. fig. 1). Deux sous-familles principales sont distinguées en fonction de la direction du transport : importateurs et exportateurs (l'origine du système de référence étant le cytoplasme). Les importateurs sont presque exclusivement présents chez les procaryotes, où ils permettent l'entrée dans la cellule de petites molécules (ions organiques et inorganiques, oligosaccharides, molécules osmoprotectrices, acides aminés ou oligopeptides) et sont dépendants d'un domaine

additionnel (*Substrate Binding Protein* ou SBP) qui lie le substrat à l'extérieur de la cellule et l'achemine vers les domaines transmembranaires.

Les exportateurs sont présents dans tous les organismes (procaryotes et eucaryotes) et catalysent la translocation à travers la membrane de substrats très différents, tels que lipides, polysaccharides, antibiotiques, toxines, peptides ou protéines. Certains exportateurs des bactéries à Gram négatif nécessitent des composants additionnels pour leur fonctionnement, notamment une protéine dans la membrane externe ainsi qu'une protéine de fusion membranaire. Ceux-ci incluent les transporteurs ABC faisant partie des systèmes de sécrétion de type I et quelques transporteurs de drogues et de lipoprotéines (Kobayashi *et al.* 2001; Delepelaire 2004; Tokuda *et al.* 2004).



**Figure 1. Diversité des transporteurs ABC.** Image modifiée à partir de Biemans-Oldehinkel *et al.* (2006a). Sont indiqués de façon schématique : les protéines de liaison de substrat (forme de pac-man), les domaines transmembranaires (rectangles), les domaines nucléotidiques (ovales). (A) Exemples d'importateurs des bactéries Gram négatives (tous les exemples sont tirés d'*Escherichia coli*) : Nik, transporteur de nickel ; Mal, transporteur de maltose/dextrine ; Btu, transporteur de vitamine B12 ; Fhu, transporteur de sidérophore/hème/vitamine B12 ; Rbs, transporteur de ribose. (B) Exemples d'importateurs de bactéries Gram positives et Archéobactéries : Opp, transporteur d'oligopeptides de *Lactococcus lactis* ; Glc, transporteur de glucose de *Sulfolobus solfataricus* ; OpuA, transporteur de glycine bêtaïne de *L. lactis* ; Gln, transporteur de glutamine/acide glutamique de *L. lactis*. (C) Exemples d'exportateurs bactériens (tous les exemples sont tirés d'*E. coli*) : Msb, flippase de lipides ; Cyd, transporteur de cystéine ; Lol, transporteur de lipoprotéines. (D) Exemples d'exportateurs eucaryotes : Mdl, transporteur mitochondrial de peptides de *Saccharomyces cerevisiae* ; TAP1/2 (ABCB2/3), transporteur humain de peptides du réticulum endoplasmique ; PDR5, transporteur chez la levure impliqué dans la résistance pléiotropique aux drogues ; P-gp (MDR1/ABCB1), transporteur humain de multiples drogues. Sont absents de ce schéma les domaines nucléotidiques isolés (appartenant à la famille ART, cf. texte). Parmi les demi-transporteurs, on retrouve des topologies TMD-NBD (e.g. Msb ou TAP) ainsi que NBD-TMD (e.g. Mdl).

Au niveau de la partie cytosolique, quelques transporteurs possèdent des domaines additionnels fusionnés aux NBDs qui leur confèrent des propriétés complémentaires. Quelques exemples sont les domaines *cystathionine-beta-synthase* (CBS) senseurs de la force ionique (Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006b); les domaines FHA de reconnaissance d'acides aminés phosphorylés (Molle *et al.* 2004); ou les extensions C-terminales capables de reconnaître des polysaccharides (Cuthbertson *et al.* 2007) ou des régulateurs transcriptionnels (Joly *et al.* 2004).

Les localisations adoptées par les transporteurs ABC dans la cellule incluent la membrane plasmique et les membranes internes (i.e. d'organites eucaryotes). Cependant, on retrouve également quelques membres qui ne possèdent pas de domaines transmembranaires. Ces protéines solubles, qui ont été classées dans 3 familles (ART : résistance aux Antibiotiques et Régulation de la Traduction ; RLI : Inhibiteur de la RNAase L ; UVR, protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la résistance aux drogues) interviendraient dans divers processus cellulaires autres que le transport (Bouige *et al.* 2002; Davidson *et al.* 2008).

A l'encontre de ce qui est observé dans la phylogénèse d'autres familles de transporteurs, la séparation des protéines ABC procaryotes et eucaryotes n'est pas l'événement évolutif le plus ancien : la ségrégation des fonctions d'import et d'export eut lieu bien avant la divergence entre procaryotes et eucaryotes (Saurin *et al.* 1999). Les procaryotes ont gardé les deux types de transporteurs, tandis que chez les eucaryotes seuls les systèmes d'export ont été conservés. La spécialisation des systèmes d'export aurait démarré très tôt dans l'ancêtre commun aux eucaryotes et procaryotes, ce qui qualifie les exportateurs ABC procaryotes comme modèle d'étude approprié pour la compréhension de leurs homologues eucaryotes.

### *Les domaines nucléotidiques*

Bien que les motifs conservés des domaines de liaison de nucléotide (NBDs) aient été identifiés à l'origine par comparaison de séquences (cf. fig. 2), l'attribution d'une fonction à ces différents motifs n'a été possible qu'après de nombreuses études génétiques, biochimiques, ainsi que les résolutions de structures tridimensionnelles de domaines NBDs. La première structure d'un domaine ABC fut publiée en 1998 (Hung *et al.* ), celle du domaine nucléotidique de l'histidine perméase de *Salmonella typhimurium*, cristallisé avec une molécule d'ATP liée en absence de  $Mg^{2+}$  (afin d'éviter l'hydrolyse du nucléotide). À présent, 62 structures de domaines nucléotidiques sont déposées dans la base de données *Protein Data Bank* (PDB)<sup>1</sup>.

**Figure 2 (page suivante). Structure primaire et secondaire des domaines nucléotidiques**, extrait de Davidson *et al.* (2004). Alignement de la séquence protéique de plusieurs domaines nucléotidiques dont la structure cristallographique a été déterminée. Les motifs conservés Walker A et B, signature ABC, Q- et H-loop sont encadrés. Les éléments de structure secondaire montrés au-dessus de l'alignement correspondent à la structure tridimensionnelle d'*E. coli* MalK (Chen *et al.* 2003a).

<sup>1</sup> *ScopTree Search for ABC transporter ATPase domain-like* sur [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/)

			s1	s2	s3	Walker A	h1
E.c.MalK	1	-----	MASVQLQNVTKAWGEVV	-----	VSKDINLDIHEGEFVVFV	PSGCGKST	LLRMI
T.l.MalK	1	-----	MAGVRLVDVVKVFGEVT	-----	AVREMSLEVVDGEFMILL	PSGCGKST	TLRMI
GlcV	1	-----	MVRIIVKNVSKVFKKGK	-----	VVALDNNVNIENGERFGIL	PSGAGKST	FMRII
MJ0796	1	-----	XIKLKNVTKTKYKXGEEII	YALKNVNLNIKEGEFVSIX	CPSGSGKST	XLNII	
E.c.MsbA	351	-----	YQGR	-----	DVPALRNINLKI	PAGKTVALVGRSGSGKST	IASLI
V.C.MsbA	351	-----	YQGR	-----	EKPALSHVSFSIPQ	GKTVALVGRSGSGKST	IANLF
cTAP1	489	PPSGLLTPLHLEGLVQFQDV	SFAYPNRP	DVLVLQGLTFTLR	PGEV	TALVGPNGSGKST	VAAALL
HlyB	1	-----	DITFRNIRFRYKPD	-----	SPVILDNINLSIKQ	GEVIGIVGRSGSGKST	LTCLI
HisP	1	-----	MMSENKLHVIDLHKRYGGHE	-----	VLKGVSLQARAGDVISI	IGSSGSGKST	FLRCI
MJ1267	1	-----	MRDTMEILRTENIVKYFGEFK	-----	ALDGVSI SVNKG	DVTLLIIGPNGSGKST	LINVI
BtuD	1	-----	MSIVMQLQDVAESTR	-----	LGPLSGEVRAGEILHLV	CPNGAGKST	LLARM

			s4	s5	h2	s6	Q loop	h3
E.c.MalK	50	AGLETITSGDLFIGEKR	MNDT	-----	PPAERG	VGMVFQSYALYPHLS	VAENMSF	
T.l.MalK	50	AGLEEPSRGQIYIGDKL	VADPEKG	-----	IFVPPKDRDIAMVFQ	SYALYPHMTVYD	NIAF	
GlcV	52	AGLDVPSTGELYFDDRL	VASNGKL	-----	IVPPEDR	KIGMVFTWALYPNL	TAFENIAF	
MJ0796	52	GCLDKPTEGEVYIDNI	KTNDLDD	-----	ELTKIRRD	KIGFVFQFNLIPL	LTALENVEL	
E.c.MsbA	390	TRFYDIDEGEILMDGH	DLDREYT	-----	LASLRNQVALVSQ	NVHLFNDT	VANNIAYA	
V.C.MsbA	390	TRFYDVSIGSICLDGH	DVDRYK	-----	LTNLRHFALVSQ	NVHLFNDT	IANNIAYA	
TAP1	552	QNLVQPTGGQLLLDGK	PLPQYE	-----	HRYLHRQVAAVG	QEPQVFGRL	QENIAYG	
HlyB	50	QRFYIPENGQVLIDGH	DLDLAD	-----	PNWLRQVG	VVLQDNVLLNRS	IIDNISLA	
HisP	53	NFLEKPSGAIIVNGQ	NINLVRDKD	GQLKVADKNQLRL	LRTRLTMVFOH	FNLSHMTVLE	NVME	
MJ1267	54	TGFLKADEGRVYFEN	KDITNKEP	-----	AELYHYGIVRT	FQTPQLKEM	TVLENLLI	
BtuD	47	AGMTS-GKGSIQFAG	QPLEAWS	-----	ATKLALHRA	YLSQQQTPPF	FATPVWHYLT	

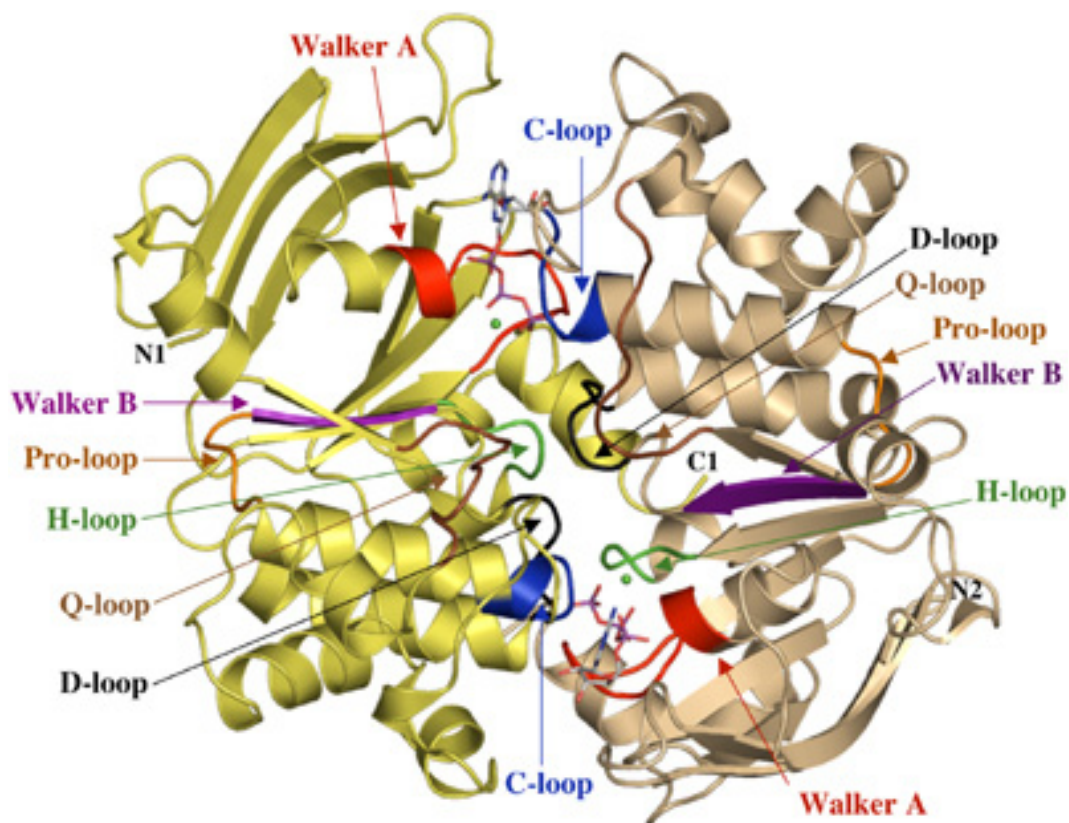
				h4			LSGGQ	h5
E.c.MalK	99	GLKLAGAKK	-----	EVINQVRNVQAEVL	QLAH--	LLDRKPKAL	SGGQ	RQVAIGRT
T.l.MalK	105	PLKLRKVPR	-----	QEIDQVRVEVAELL	GLTE--	LLNRKPREL	SGGQ	RQVRALGRA
GlcV	106	PLTNMKMSK	-----	EEIRKRVEEVAKIL	DIHH--	VLNHFPREL	SGGQ	QQRVALARA
MJ0796	107	PLIFKYRGAX	-----	SGEERRKRALECL	KXAELEER-	FANHKPNQL	SGGQ	QQRVAIARA
E.c.MsbA	441	RTEQYSREQI	-----	EEAARMAYAMDF	INKMDNGLD	TVIGENGVL	SGGQ	RQRTAIARA
V.C.MsbA	441	AEGEYTREQI	-----	EQAARQAAMEFI	ENMPQGLD	TVIGENGTS	SGGQ	RQRTAIARA
TAP1	603	LTQKPTMEEI	-----	TAAAVKSGAHSF	ISGLPQGYD	TEVDEAGS	QLSGGQ	RQVAIARA
HlyB	101	NPG-MSVEKV	-----	IYAAKLAGAHDF	ISELREGYNT	IVGEQGAGL	SGGQ	RQRTAIARA
HisP	117	APIQVLGLS	-----	KHDAREALKYL	AKVGIDER-	AQGYKPVHL	SGGQ	QQRVSIARA
MJ1267	106	GEICPGESPLNSLFY	KKWIPKEEEMVEK	AFKILEFLKLSH--	LYDRKAGEL	SGGQ	MKLYEIGRA	
BtuD	95	H--QHDKTRT	-----	ELLNDVAGALAL	DDK--LGRSTNQ	LSGGEWQVR	VRLAAV	

				Walker B				H motif					
				s7		h6		s8		h7		s9	
E.c.MalK	148	LVAE-P-----	SVFLLD	DEPLSNLDAALRVQM	RIEISRLHKRLGR	TMIVYTHDQVEAM	TADKI						
T.l.MalK	154	IVRK-P-----	QVFLMD	EPLSNLDAKLVR	MRaelKKLQRQLG	VTTIYVTHDQVEAM	TMGDRI						
GlcV	155	LVKD-P-----	SLLLD	EPFSNLDARMRDS	SARALVKEVQSRL	GVTLVVSHPADIF	AIADRV						
MJ0796	160	LANN-P-----	PIIL	ADEPTGALDSKT	GKIXQLLKKLNEED	GKTVVVVTHDIN	VARFGE-RI						
E.c.MsbA	495	LLRDSP-----	ILIL	DEATSALDTERAI	QAALDELQK--NRT	SLVIAHRLS-TIEKA	DEI						
V.C.MsbA	495	LLRDAP-----	VLIL	DEATSALDTERAI	QAALDELQK--NKT	VLVIAHRLS-TIEQA	DEI						
TAP1	657	LIRK-P-----	CVLIL	DATSALDANSQLQ	VEQLLYESPERYSR	SVLLITQHLS-LVEQ	ADHI						
HlyB	154	LVNN-P-----	KILIF	DEATSALDYSEH	VIMRNMHKICK--GR	TVIIIAHRLS-TVK	NADRI						
HisP	168	LAME-P-----	DVLLF	DEPTSALDP	ELVGEVLRIMQQL	AEE-GKTMVVVTHE	MGFAHVS	SHV					
MJ1267	168	LMTN-P-----	KMIVM	DEPIAGVAPLAH	DIFNHVLELAK-GIT	FLIEHRLDIV	LNIDHL						
BtuD	141	VLQITPQANPAGQL	LLLD	DEPMNSLDVAQ	SALDKILSALCQQ-G	LAIVMSSHD	LNHTLRHA						

Protein	Position	Sequence	Position	Notes
E.c.MalK	205	VVLDAGRVAQVGKPLELYHPADRFVAGFIG-----	235	(to 371)
T.l.MalK	211	AVMNRGVVLQVGSPDEVYDKPANTFVAGFIG-----	241	(to 372)
GlcV	212	GVLVKGKLVQVGKPEDLYDNPVSIQVASLIG-----	242	(to 353)
MJ0796	216	IYLDKDEVER-EKLRGFDDR-----	235	(end)
E.c.MsbA	550	VVVEDGVIVERGTHNDLLEH-RGVYAQLHKMQFGQ-----	582	(end)
V.C.MsbA	550	LVVDEGEIIERGRHADLLAQ-DGAYAQLHRIQFGE-----	582	(end)
TAP1	714	LFLEGGAIREGTHQQLMEK-KGCYWAMVQAPADAPE-----	748	(end)
HlyB	209	IVMEKGKIVEQGGKHKELLSEPESLYSYLYQLQSD-----	241	(end)
HisP	224	IFLHGQKIEEGDPEQVFGNPQSPRLQQLKGSLLKLEH-----	262	(end)
MJ1267	224	YVMFNGQIIAEGRGEEIEKNVLSDPKVVEIYIGE-----	257	(end)
BtuD	204	WLLKGGKMLASGRREVLTPPNLAQAYGMNFRRLDIEGHRMLIS	247	(end)



Le modèle de fonctionnement des domaines nucléotidiques qui ressort de ces études comporte une dimérisation des deux domaines nucléotidiques d'un transporteur suite à la liaison des nucléotides (Smith *et al.* 2002). Les NBDs forment un sandwich inversé où deux molécules d'ATP sont piégées à l'interface du dimère (cf. fig. 3). Les sites de liaison de nucléotide sont composites : la signature ABC d'un domaine vient compléter le motif A et B de Walker de l'autre domaine pour former un site de liaison complet. Le motif A de Walker ou *phosphate-binding loop* (*P-loop*) (GxxGxGKS/T, où x représente un acide aminé quelconque) intervient dans la liaison de l'ATP via des interactions électrostatiques avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide. L'aspartate du motif B de Walker ( $\Phi\Phi\Phi\Phi D$ , où  $\Phi$  symbolise un acide aminé hydrophobe) contribue à la géométrie du site actif en participant à la coordination du  $Mg^{2+}$  catalytique. La signature LSGGQ contacte le phosphate  $\gamma$  depuis la sous-unité opposée. Après la dimérisation induite par la liaison du nucléotide, l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  entraînerait la dissociation du dimère (Lu *et al.* 2005) et le relargage de l'ADP et du phosphate de façon à permettre le début d'un nouveau cycle d'hydrolyse.



**Figure 3. Structure cristallographique du domaine nucléotidique du transporteur d'hæmolysine HlyB, formant un dimère en présence d'ATP/Mg<sup>2+</sup>.** Les molécules d'ATP (représentées en bâtons) et les cations Mg<sup>2+</sup> (sphères vertes) se trouvent à l'interface entre les deux monomères (montrés en beige et jaune). La position des motifs conservés des protéines ABC (décrits pour la plupart dans le texte) est indiquée. La stabilisation du dimère en présence d'ATP a été rendue possible grâce à la mutation en alanine de l'histidine conservée de l'*H-loop* (H662A), rendant le NBD inactif. Figure extraite de Zaitseva *et al.* (2005a).

Outre les motifs A, B de Walker et la signature ABC, d'autres résidus conservés semblent jouer un rôle important dans le mécanisme catalytique des domaines nucléotidiques (cf. fig. 2 pour la position dans la séquence primaire et fig. 3 pour leur disposition tridimensionnelle):

- ∞ Un glutamate très conservé qui suit l'aspartate du Walker B a été proposé comme étant la base catalytique (cf. fig. 6 et texte) qui activerait la molécule d'eau du site actif pour réaliser une attaque nucléophile sur le phosphate  $\gamma$  (Moody *et al.* 2002; Orelle *et al.* 2003). Sa mutation en glutamine a permis en 2002 la stabilisation d'un dimère de domaine nucléotidique en présence d'ATP et sa cristallisation concomitante (Smith *et al.* 2002). La même mutation a été utilisée pour cristalliser le transporteur entier de maltose MalFGK avec de l'ATP et du maltose liés (Oldham *et al.* 2007). Sur le transporteur de multiples drogues BmrA, cette mutation stabilise une conformation fermée en présence d'ATP et permet sa cristallisation en deux dimensions (Orelle *et al.* 2008b).
- ∞ Une histidine (donnant le nom *H-loop* à la boucle correspondante) située à ~30 acides aminés du motif B de Walker (en C-terminal) jouerait un rôle dans le positionnement au cœur du site actif de plusieurs chaînes latérales, du cation de  $Mg^{2+}$  et d'une molécule d'eau et serait également critique pour l'hydrolyse (Zaitseva *et al.* 2005b). La cristallisation d'un dimère du domaine nucléotidique du transporteur de l'hémolysine HlyB en présence d'ATP (cf. fig. 2) a été possible après mutation de cette histidine en alanine (Zaitseva *et al.* 2005a). Ces auteurs ont proposé un fonctionnement du glutamate et de l'histidine en tant que dyade catalytique dans un mécanisme de catalyse assisté par le substrat, qui sera décrit ultérieurement (cf. fig. 6).
- ∞ Finalement, une glutamine conservée dans la boucle appelée *Q-loop* s'engage dans de nombreuses interactions au sein du site actif et, de façon intéressante, avec les domaines transmembranaires (Locher *et al.* 2002; Dalmas *et al.* 2005b). Cette interaction constitue à l'heure actuelle la piste la plus importante dans la compréhension du dialogue TMD-NBD (cf. section suivante).

### *Les domaines transmembranaires : leçons des structures 3D*

Le degré de conservation de séquence des domaines transmembranaires est beaucoup moins important que pour les domaines nucléotidiques. La structure secondaire est composée d'hélices  $\alpha$ , généralement 2x6 chez les exportateurs et pouvant aller de 2x5 jusqu'à 2x10 chez les importateurs (Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006a). Certains transporteurs, dont la sous-famille ABCC humaine, possèdent des hélices supplémentaires en N-terminal. Les modes de liaison et de translocation de substrat se multiplient, en accord avec la vaste diversité de substrats reconnus et transportés par les transporteurs ABC. Cependant, les structures tridimensionnelles de transporteurs entiers disponibles aujourd'hui (cf. tableau 1 et fig. 4) suggèrent un mécanisme commun aux exportateurs et importateurs (Dawson *et al.* 2007a) :

Tandis que la liaison d'ATP induirait une ouverture du domaine transmembranaire vers l'extérieur, le relargage des produits d'hydrolyse, ADP et phosphate, serait concomitant avec une ouverture vers l'intérieur.

Ce modèle d'accès alterné aux deux cotés de la membrane, proposé il y a 40 ans (Jardetzky 1966) pour les transporteurs de la famille MFS (discutés plus loin), semblerait également pertinent pour les transporteurs ABC. Une différence fondamentale, néanmoins, réside dans le fait que la liaison de nucléotide et non de substrat contrôlerait l'ouverture du transporteur vers l'intérieur ou l'extérieur (Hollenstein *et al.* 2007a). Cependant, la contribution du substrat dans le cycle conformationnel des transporteurs ABC est sous-estimée dans ce modèle, étant donné la presque absence de structures obtenues en présence de substrat ; seul le transporteur du maltose a été cristallisé avec du substrat lié dans le domaine transmembranaire (cf. tableau 1). D'ailleurs, *in vivo* les concentrations d'ATP intracellulaires sont jusqu'à 10-fois plus élevées que leur valeur de  $K_M$ , ce qui suggère que les transporteurs auraient leurs domaines nucléotidiques saturés en nucléotide de manière quasi-permanente (Oldham *et al.* 2007). La liaison de substrat joue probablement un rôle important pour atteindre l'état de transition et compléter le cycle, et il est possible que cette contribution soit différente entre importateurs et exportateurs. L'addition de la SBP et du substrat induit notamment une forte stimulation de l'activité ATPase des importateurs (Davidson *et al.* 1992; Liu *et al.* 1997), alors que la stimulation par le substrat semble plus modeste chez les exportateurs voire même absente (Ernst *et al.* 2008).

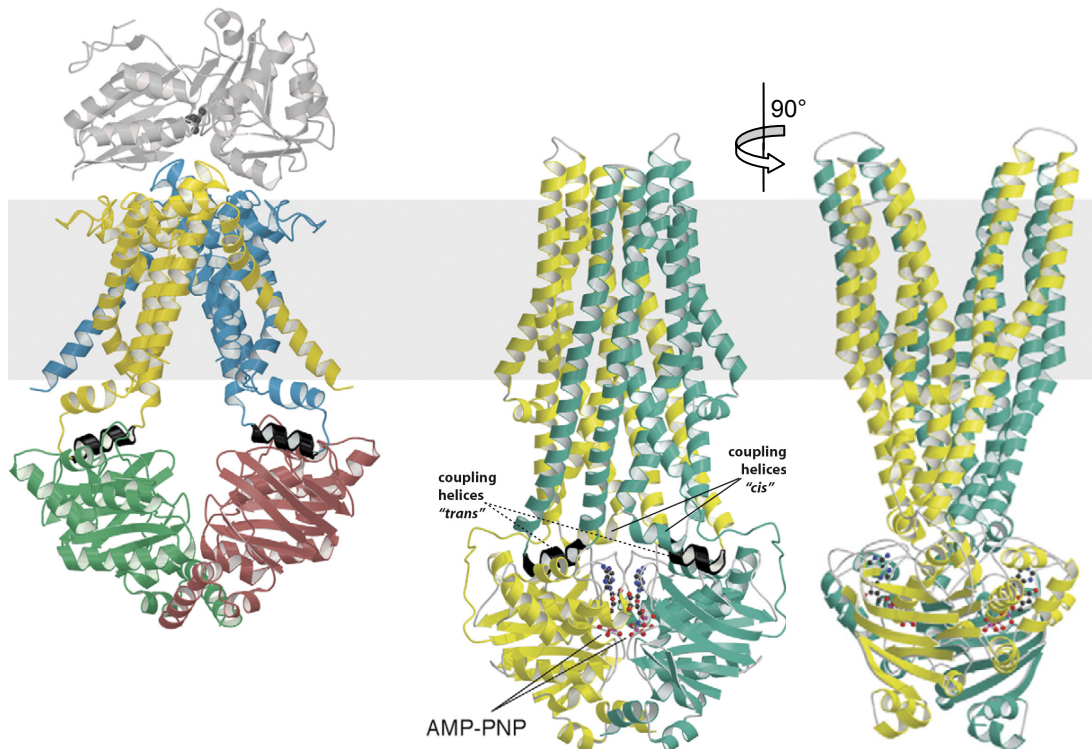
Une autre caractéristique ressort des structures cristallographiques des transporteurs, ainsi que de plusieurs études biochimiques: l'existence de boucles cytosoliques appelées *coupling helices* (cf. fig. 4) qui se situent entre deux hélices transmembranaires successives et s'insèrent dans les domaines nucléotidiques, pouvant ainsi coupler le mouvement des domaines nucléotidiques et transmembranaires (Locher *et al.* 2002; Dalmás *et al.* 2005b). Elles sembleraient interagir de manière flexible avec la *Q-loop* des NBDs et transmettraient de cette façon aux domaines transmembranaires les changements conformationnels qui s'opèrent au niveau des domaines nucléotidiques et vice-versa. Chez les importateurs, ces boucles intracellulaires portent un motif conservé contenant la séquence EAA qui avait été identifié en réalisant des comparaisons de séquences (Dassa *et al.* 1985). Ces auteurs ont confirmé par la suite l'implication de ce motif dans l'interaction entre NBD et TMD du transporteur de maltose (Mourez *et al.* 1997).

Par ailleurs, l'étude de 8 structures de domaines nucléotidiques a révélé la présence d'une région de ~30 acides aminés, débutant dans la *Q-loop* et allant jusqu'au motif B de Walker, d'une variabilité structurale considérable (Schmitt *et al.* 2003). Ces auteurs l'ont appelée « *Structurally Diverse Region* » (SDR) et proposé qu'elle contribuerait à la spécificité de reconnaissance entre les domaines transmembranaires et nucléotidiques.

**Tableau 1. Structures cristallographiques disponibles de transporteurs ABC entiers** (comprenant deux domaines transmembranaires (TM) et deux domaines nucléotidiques (NBD), ainsi que chez quelques importateurs une protéine de liaison de substrat ou SBP pour *Substrate Binding Protein*). AMPPNP : Adénosine 5'-( $\beta,\gamma$ -imido)triphosphate. L'orthovanadate ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) mime le phosphate  $\gamma$  et bloque les transporteurs ABC dans une conformation proche de l'état de transition d'hydrolyse, avec l'ADP et l'orthovanadate dans le site actif.  $\text{V}_4\text{O}_{12}$  : cyclotetranadate.

	protéine	organisme	code PDB	résolution (Å)	ligand(s) dans le NBD	autres ligands	nombre d'hélices TM	ouverture des domaines TM	référence
exportateurs	Sav1866	<i>Staphylococcus aureus</i>	2HYD	3	ADP		12	extérieure	Dawson <i>et al.</i> 2006
			2ONJ	3.4	AMPPNP		12	extérieure	Dawson <i>et al.</i> 2007b
	MsbA	<i>Escherichia coli</i>	3B5W	5.3			12	intérieure	Ward <i>et al.</i> 2007
		<i>Vibrio cholerae</i>	3B5X	5.5			12	intérieure	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	3B5Z	4.2	ADP- $\text{VO}_4$		12	extérieure	
			3B5Y 3B60	4.5 3.7	AMPPNP		12	extérieure	
importateurs	BtuCD	<i>Escherichia coli</i>	1L7V	3.2	$\text{V}_4\text{O}_{12}$		20	extérieure	Locher <i>et al.</i> 2002
			2QI9	2.6	-	en complexe avec la SBP BtuF	20	fermé	Hvorup <i>et al.</i> 2007
	HI1470/1	<i>Haemophilus influenza</i>	2NQ2	2.4	-		20	intérieure	Pinkett <i>et al.</i> 2007
	ModBC	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	2ONK	3.1	phosphate	en complexe avec la SBP ModA liant du $\text{WO}_4$	12	intérieure	Hollenstein <i>et al.</i> 2007b
		<i>Methanosarcina acetivorans</i>	3D31	3.5	-	$\text{WO}_4$ lié dans le domaine régulateur	12	intérieure	Gerber <i>et al.</i> 2008
	MalFGK	<i>Escherichia coli</i>	2R6G	2.8	ATP	en complexe avec la SBP MalE ; maltose lié dans le domaine TM	14	extérieure	Oldham <i>et al.</i> 2007
	MetNI	<i>Escherichia coli</i>	3DHW	3.7	-		10	intérieure	Kadaba <i>et al.</i> 2008

**Figure 4. Structures cristallographiques de 2 transporteurs ABC** : l'importateur de  $\text{MoO}_4/\text{WO}_4$  ModABC d'*Archeoglobus fulgidus* (gauche) et l'exportateur de multiples drogues Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (centre et droite, même structure avec 90° rotation). ModABC est composé de 5 sous-unités : deux transmembranaires (ModB), deux nucléotidiques (ModC) et la SBP (ModA). Sav1866 est un homodimère, chaque sous-unité contient un domaine transmembranaire et un domaine nucléotidique fusionnés. La structure de ModABC en absence de nucléotide révèle une conformation des parties transmembranaires ouverte vers l'intérieur, alors que l'exportateur de multiples drogues Sav1866 en complexe avec l'AMPPNP (analogue non hydrolysable de l'ATP) montre une conformation ouverte vers l'extérieur. La boîte grise représente la position approximative de la membrane. Les NBDs ModC adoptent une forme ouverte, alors que les NBDs de Sav1866 montrent une conformation fermée, avec deux molécules d'AMPPNP à l'interface. ModB présente une *coupling helix* (cf. texte), alors que Sav1866 en possède deux. Une des deux *coupling helices* de Sav1866 établit des contacts avec le NBD de la même sous-unité (en *cis*) ; l'autre (colorée en noir) interagit avec le NBD de la sous-unité voisine (en *trans*). Chez l'importateur, les contacts entre NBD et *coupling helix* (colorée en noir) s'établissent en *cis*. Il est à noter également la différence dans le positionnement des NBDs par rapport à la membrane : chez Sav1866, l'extension des hélices transmembranaires éloigne les NBDs jusqu'à ~25 Å de la membrane. Image modifiée à partir de Hollenstein *et al.* (2007a).



### Questions ouvertes sur le mécanisme fonctionnel des transporteurs ABC

#### Couplage entre cycle hydrolytique et cycle de transport

Nombreux détails dans le mécanisme des transporteurs ABC restent controversés à l'heure actuelle. Concernant le couplage entre hydrolyse d'ATP et translocation de substrat, par exemple, y a-t-il hydrolyse dans chacun des deux sites de liaison d'ATP lors du cycle de transport ? La stoechiométrie : quel est le nombre de molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transporté ? Des données biochimiques très contradictoires existent à ce sujet, qui rapportent des stoechiométries allant de 1 jusqu'à 50 molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transporté (Patzlaff *et al.* 2003). Ces études se heurtent à nombreuses

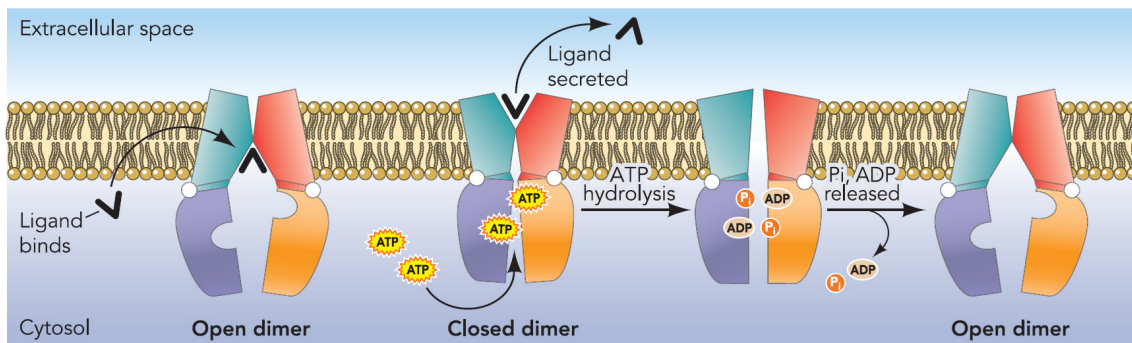
difficultés expérimentales, une des plus importantes étant le maintien de la stabilité du transporteur purifié (parfois un complexe de différents sous-unités) après son extraction de la membrane par des détergents. Les transporteurs purifiés montrent souvent une forte activité basale en absence de substrat, ce qui entraîne une détermination imprécise de la stœchiométrie en présence de substrat. Cette activité « découplée » pourrait même être inhérente au transporteur. Alors que les importateurs semblent être plus ou moins dépendants de leur SBP pour l'hydrolyse de l'ATP, ce qui permet d'assurer un couplage fin entre transport et hydrolyse, certains exportateurs montreraient une activité « physiologique » d'hydrolyse basale (en absence de substrat), comme il a été montré pour la glycoprotéine-P (Al-Shawi *et al.* 2003), voire complètement découplée (indépendante de la présence de substrat), comme dans le cas de Pdr5 (Ernst *et al.* 2008).

En présence de substrat, des études détaillées réalisées sur la glycoprotéine-P et sur le transporteur osmorégulé OpuA arrivent quand même de manière répétée à un rapport de 2 molécules d'ATP hydrolysées par molécule de substrat transporté (Eytan *et al.* 1996; Sauna *et al.* 2000; Sauna *et al.* 2001; Patzlaff *et al.* 2003). Cette stœchiométrie suggère que les deux sites nucléotidiques du dimère hydrolysent le nucléotide au cours de chaque cycle. Cela a été en effet montré pour la glycoprotéine-P, le transporteur associé à la présentation d'antigène TAP et l'importateur d'histidine (Higgins *et al.* 2004). D'autres études montrent, par contre, que l'hydrolyse d'ATP dans les deux sites n'est pas forcément nécessaire au transport. Ainsi, l'importateur d'histidine peut encore transporter avec un domaine nucléotidique inactif (Nikaido *et al.* 1999), et seulement un site nucléotidique du canal de chlorure CFTR semble hydrolyser le nucléotide lors d'un cycle d'ouverture-fermeture (Basso *et al.* 2003). En accord avec cette idée, nombreux transporteurs possèdent un site catalytique canonique et un site catalytique dégénéré, où un ou plusieurs motifs conservés (A et B de Walker, *H-loop* ou signature ABC, notamment) divergent du consensus. Quelques exemples de transporteurs où cette asymétrie a été étudiée sont MRP1 (Payen *et al.* 2003), Pdr5 (Ernst *et al.* 2008) ainsi que les hétérodimères TAP1/TAP2 (Perria *et al.* 2006; Procko *et al.* 2006), ABCG5/G8 (Zhang *et al.* 2006) et LmrC/LmrD (Lubelski *et al.* 2006b).

Il semble donc difficile de concevoir un mécanisme catalytique unique face à une telle diversité de transporteurs. Pour la glycoprotéine-P, un modèle a été proposé où l'hydrolyse de l'ATP a lieu de façon alternée dans chaque site nucléotidique (Senior *et al.* 1995). Par la suite, des variantes de ce modèle ont été développées pour les importateurs de maltose et d'histidine, ainsi que l'exportateur LmrA (van Veen *et al.* 2001). Ces modèles proposent que l'hydrolyse de l'ATP fournit la source principale d'énergie (*power stroke*) pour effectuer le transport, les deux événements d'hydrolyse (un dans chacun des deux sites nucléotidiques) pouvant être couplés à différentes étapes du cycle de transport.



**Figure 5. Modèle *ATP-switch* proposé pour expliquer le cycle de transport/hydrolyse d'un transporteur ABC** (illustré ici pour un exportateur). Quatre étapes ou changements conformationnels sont couplés à (i) la liaison de ligand, (ii) la liaison d'ATP, (iii) l'hydrolyse d'ATP et (iv) le relargage d'ADP/P<sub>i</sub>. La conformation *apo* du transporteur correspond à un état de forte affinité pour le ligand et sa liaison entraîne une augmentation d'affinité des domaines nucléotidiques pour l'ATP. La liaison du nucléotide induit la fermeture des domaines nucléotidiques, avec réarrangement des domaines transmembranaires qui basculent dans une conformation de faible affinité pour le ligand, ouverte vers l'extérieur. La dimérisation des domaines nucléotidiques entraîne également l'hydrolyse du nucléotide, et le relargage de P<sub>i</sub> et ADP rétablit la conformation *apo* initiale. La conformation fermée des domaines nucléotidiques n'est notamment pas stable en présence d'ADP/P<sub>i</sub> et l'affinité du transporteur pour les produits d'hydrolyse est faible. Ce modèle peut être adapté pour tenir compte des variations entre différents transporteurs. Par exemple, chacune des trois dernières étapes pourrait être couplée à la translocation de substrat, en fonction du transporteur et du substrat. L'hydrolyse d'ATP pourrait se faire dans un seul site nucléotidique, l'autre pouvant garder un nucléotide lié au cours du cycle. Image et modèle tirés de Linton (2007). P<sub>i</sub> : phosphate inorganique.



Plus récemment, un autre modèle (cf. fig. 5 et légende) a été avancé en tenant compte de données biochimiques nouvelles, de l'asymétrie des domaines nucléotidiques chez certains transporteurs, ainsi que des données structurales qui révèlent les sites de liaison/hydrolyse à l'interface des deux domaines nucléotidiques, ce qui suggère un fonctionnement concerté des deux sites nucléotidiques. Ce modèle a été baptisé *ATP-switch* car la liaison d'ATP constitue l'étape énergétiquement la plus importante (plutôt que l'hydrolyse) : la liaison de nucléotide induit la dimérisation des domaines nucléotidiques et entraîne l'hydrolyse comme conséquence inexorable de cette conformation fermée. Ce modèle est largement inspiré des données disponibles sur la glycoprotéine-P et d'autres exportateurs, notamment les travaux portant sur la protéine CFTR. Son fonctionnement en tant que canal d'ions chlorure permet une étude cinétique et thermodynamique : en utilisant la technique de *patch-clamp*, il est possible de suivre l'activité d'un seul transporteur avec une bonne résolution temporelle (Gadsby *et al.* 2006).

Le modèle *ATP-switch* est-il alors applicable aux importateurs ? Comme discuté plus haut, les réarrangements conformationnels des domaines transmembranaires et nucléotidiques en réponse à la liaison de nucléotide semblent comparables entre exportateurs et importateurs, ce qui pourrait indiquer l'existence d'un mécanisme commun aux deux types de transporteurs (Davidson *et al.* 2007). D'un autre côté, les structures disponibles de transporteurs entiers révèlent quelques différences très notables, comme le positionnement des *coupling helices* et la distance des domaines nucléotidiques par rapport à la membrane (cf. légende de la figure 4). De plus, l'implication de la SBP dans le cycle de transport/hydrolyse des importateurs confère probablement à ceux-ci des caractéristiques uniques. Des expériences récentes de résonance

paramagnétique électronique réalisées sur le transporteur de maltose montrent notamment que la liaison d'ATP n'est pas suffisante à la fermeture des sites nucléotidiques dans le transporteur entier (alors que c'est le cas en absence des domaines transmembranaires), la *maltose binding protein* doit également se fixer sur le transporteur pour permettre la fermeture des NBDs (Orelle *et al.* 2008a). Ceci expliquerait le couplage fin entre transport et hydrolyse observé généralement chez les importateurs.

## La phosphorylation des transporteurs ABC

Néanmoins, les modèles évoqués plus haut ne prennent en compte que les événements liés au transport de substrat et à l'hydrolyse de l'ATP. Or, selon les transporteurs, des mécanismes de régulation modifiant leur activité peuvent se rajouter à ces schémas. Il en est ainsi par exemple de la phosphorylation : plusieurs transporteurs ABC sembleraient subir des phosphorylations capables d'altérer leur activité de transport et/ou d'hydrolyse.

Le cas le mieux étudié est CFTR, qui est régulée par les protéines kinases PKA et PKC. Ces kinases phosphorylent cette protéine dans un domaine régulateur unique (appelé domaine R) qui contient ~20 sites potentiellement phosphorylables. La phosphorylation par PKA, dépendant de la concentration intracellulaire d'AMPc, résulte en l'ouverture du canal. La phosphorylation de CFTR par PKC augmenterait l'intensité de sa réponse à la kinase PKA (Dahan *et al.* 2001; Aleksandrov *et al.* 2007). Une régulation par phosphorylation a été également proposée pour ABCA1 (See *et al.* 2002; Roosbeek *et al.* 2004) et pour la glycoprotéine-P (Germann *et al.* 1995; Szabo *et al.* 1997), mais les conséquences sont moins bien connues que dans le cas de CFTR.

Plus récemment, la phosphorylation de trois autres transporteurs a été mise en évidence : ABCG2 aurait besoin d'être phosphorylée par la kinase Pim-1 pour expulser des drogues (Xie *et al.* 2008), SUR2B serait phosphorylé par la PKA dans le second NBD (Shi *et al.* 2007; Shi *et al.* 2008a), tandis que le transporteur Ycf1p, homologue chez la levure de ABCC1 (MRP1), serait régulé négativement par phosphorylation dans sa région N-terminale (Paumi *et al.* 2008).

## Mécanisme catalytique d'hydrolyse

Concernant le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP par les transporteurs ABC, un modèle de catalyse générale acide-base (cf. fig. 6) a été proposé, inspiré par les études du groupe de Yoshida sur la  $F_1$ -ATPase, qui fait partie, tout comme les protéines ABC, de la sous-famille RecA de protéines à *P-loop* (Vetter *et al.* 1999). Le groupe de Yoshida identifia un glutamate de la  $F_1$ -ATPase qui agit comme base catalytique, activant une molécule d'eau proche du phosphate- $\gamma$  et favorisant ainsi une attaque nucléophile sur ce phosphate (Amano *et al.* 1994).

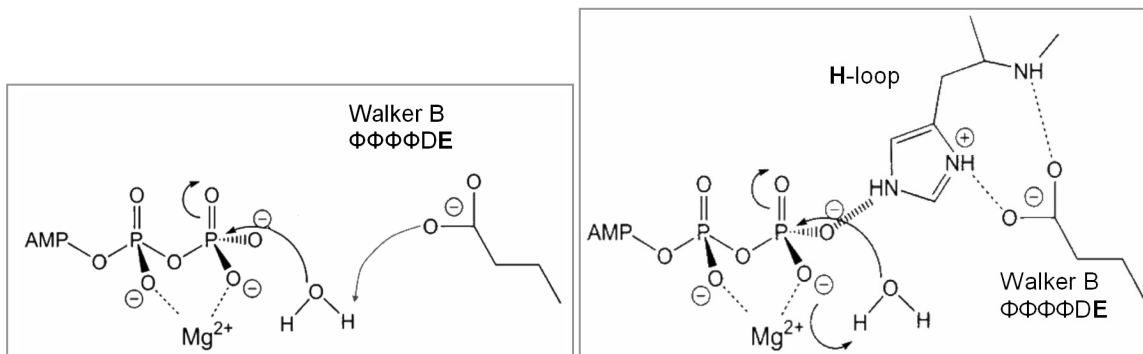
Suite à la résolution de la structure du premier domaine nucléotidique d'un transporteur ABC, l'histidine perméase (Hung *et al.* 1998), il a été proposé un rôle de base catalytique pour



le glutamate conservé qui suit le motif B de Walker (Muneyuki *et al.* 2000; Geourjon *et al.* 2001). Cette hypothèse a été validée par des études de mutagenèse sur deux domaines nucléotidiques de *Methanococcus jannaschii* (Moody *et al.* 2002), ainsi que sur le transporteur BmrA de *Bacillus subtilis* (Orelle *et al.* 2003).

Par contre, des études biochimiques et structurales sur le domaine nucléotidique du transporteur d'hæmolysine HlyB (Zaitseva *et al.* 2005a,b) ont remis en question ce modèle et conduit à la proposition d'un mécanisme différent : une catalyse assistée par le substrat. Le même mécanisme a été proposé pour les GTPases de type Ras, où aucun résidu pouvant agir en tant que base catalytique n'a été identifié (Schweins *et al.* 1995). L'histidine conservée de l'*H-loop* aurait un rôle prépondérant dans le site actif, orchestrant la position du glutamate, de l'ATP et de la molécule d'eau responsable de l'attaque nucléophile. Cette molécule d'eau serait polarisée par le phosphate  $\gamma$  lui-même, le transfert de charges étant favorisé par l'histidine (cf. fig. 6). Dans ce modèle, le glutamate reste quand même un résidu clé dans l'architecture du site actif et formerait avec l'histidine une dyade catalytique (Hanekop *et al.* 2006).

Il est envisageable que différents transporteurs aient adopté différents mécanismes catalytiques en modifiant légèrement l'architecture du site actif à partir d'un échafaudage commun. Ainsi, une étude récente de mutagenèse réalisée sur Pdr5 semble indiquer que ce transporteur ne fonctionnerait pas comme HlyB mais suivrait plutôt un mécanisme catalytique de type acide-base : la mutation en alanine de l'histidine conservée du second NBD n'affecte pas l'activité ATPase du transporteur, alors que la substitution du glutamate conservé du même NBD par une glutamine abolit complètement l'hydrolyse de l'ATP (Ernst *et al.* 2008).



**Figure 6. Schéma des deux mécanismes catalytiques proposés pour l'hydrolyse de l'ATP par les protéines ABC : catalyse générale acide-base (gauche) et catalyse assistée par le substrat (droite).** Le glutamate conservé suivant le motif B de Walker agit en tant que base catalytique dans le modèle de catalyse générale acide-base. Dans le modèle de catalyse assistée par le substrat, ce résidu forme une dyade catalytique avec l'histidine conservée de l'*H-loop* (cf. texte).  $\Phi$  représente un acide aminé hydrophobe. Image modifiée à partir de Hanekop *et al.* (2006).

## LA RESISTANCE A DE MULTIPLES DROGUES (MDR)

### *Le phénomène MDR et les transporteurs ABC humains*

Le prix Nobel allemand Paul Ehrlich, père de la chimiothérapie, pronostiquait au début du XXe siècle que le développement de microorganismes résistants suivrait comme une ombre l'utilisation de n'importe quel antibiotique<sup>2</sup>. Cette affirmation a trouvé un large soutien depuis : Des insectes résistants au DDT furent trouvés à peine un an après l'introduction de l'insecticide (Georghiou 1972). De plus, une résistance croisée au DDT était induite par la sélection avec d'autres insecticides (Ariaratnam *et al.* 1974), de même que le traitement avec le DDT avait induit auparavant une résistance croisée au *pyrethrum*, qui était utilisé depuis des siècles (Whitehead 1959). Des bactéries résistantes à plusieurs antibiotiques avaient été identifiées déjà dans les années 50 (Barber *et al.* 1958). Chez l'homme, la chimiothérapie combinée pour le traitement des cancers résistants fut introduite en 1963 (Johnson *et al.* 1963), et peu après de premières tumeurs développaient des résistances croisées.

L'isolement de lignées cellulaires à partir des cancers multirésistants, ainsi que la sélection de lignées par exposition aux anticancéreux (Biedler *et al.* 1970) permit alors l'étude de la résistance croisée ou résistance à de multiples drogues (MDR). Les premières explications pour ce phénomène proposaient une perméabilité réduite de la membrane plasmique (Ling *et al.* 1974), la modulation de cette perméabilité serait au cœur du phénomène MDR (Carlsen *et al.* 1976). Cependant, l'attention se tourna aussitôt vers une protéine de surface surexprimée dans les lignées résistantes : cette protéine fut appelée glycoprotéine-P ou P-gp pour son rôle présumé dans la perméabilité aux drogues (Juliano *et al.* 1976; Riordan *et al.* 1979). Le gène codant pour la P-gp fut séquencé et appelé *mdr1* (Chen *et al.* 1986). La forte homologie de séquence de la P-gp avec le transporteur d'hémolysine HlyB ainsi qu'avec la famille de transporteurs membranaires liant l'ATP décrite dans la même année chez les bactéries (Gerlach *et al.* 1986; Higgins *et al.* 1986) suggérait la possible implication d'autres transporteurs ABC dans les phénomènes de résistance aux drogues.

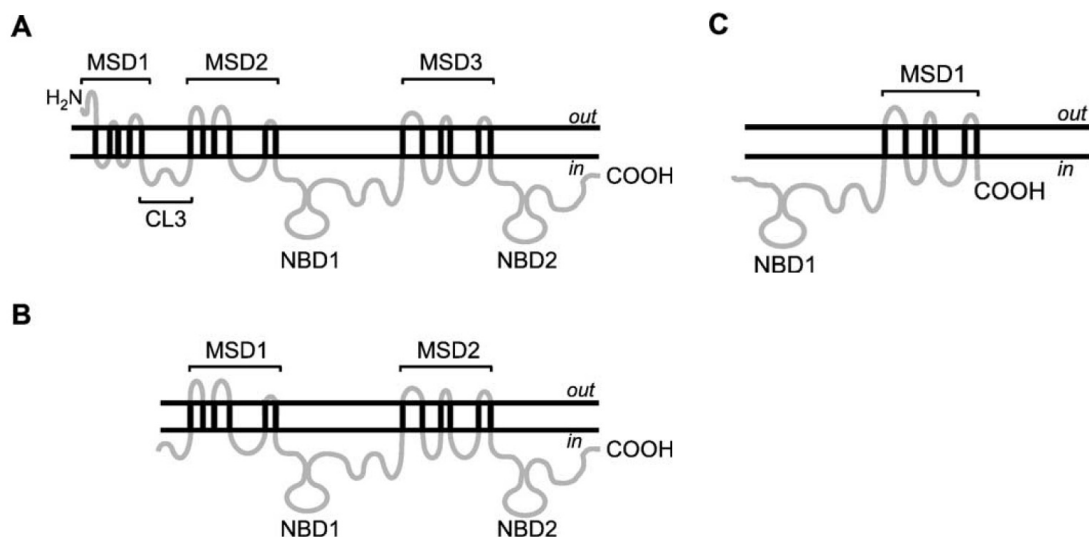
Ainsi, en 1992, des lignées cancéreuses présentant un phénotype MDR furent isolées où la glycoprotéine-P n'était pas surexprimée, mais un autre transporteur ABC était à l'origine de la résistance ; cette protéine fut donc appelée *Multidrug Resistance-associated Protein* ou MRP (Cole *et al.* 1992). Un troisième transporteur ABC impliqué dans la résistance aux anticancéreux fut identifié indépendamment par trois groupes dans différents tissus ou lignées cellulaires: le cancer de sein (Chen *et al.* 1990), le placenta (Allikmets *et al.* 1998) et des cellules résistantes à la mitoxantrone (Miyake *et al.* 1999). Cette nouvelle protéine fut donc baptisée avec trois noms: BCRP pour *breast cancer resistance protein*, ABCP pour transporteur

---

<sup>2</sup> [www.uni-kassel.de/fb19/microbiology/nor/ab1.html](http://www.uni-kassel.de/fb19/microbiology/nor/ab1.html)

ABC de placenta, et MXR pour gène de résistance à la mitoxantrone. Dans le cadre d'un effort pour uniformiser la nomenclature des gènes humains (HUGO Gene Nomenclature Committee<sup>3</sup>), les sept sous-familles des transporteurs ABC humains ont été nommés ABCA-G (Dean *et al.* 2001). Les trois ABC impliqués dans le phénomène MDR sont appelés désormais ABCB1 (P-gp/MDR1), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BCRP/ABCP/MXR).

De nombreuses études ont été menées sur ces protéines, visant à déterminer, entre autre, leur spécificité de substrat, leur mécanisme fonctionnel et leur adéquation comme cibles thérapeutiques. Leur topologie (prédite) est présentée dans la figure 7 ci-dessous. ABCB1, ABCC1 et ABCG2 possèdent une spécificité de substrat remarquablement vaste : En plus de drogues et toxines, ces protéines sont capables de transporter des carcinogènes, des pesticides, des métaux ainsi que des produits de peroxydation de lipides (Leslie *et al.* 2005). Même si d'autres transporteurs ABC (13 sur les 48 transporteurs ABC identifiés dans le génome humain) seraient capables de transporter des drogues chimiothérapeutiques, seulement ABCB1, ABCC1 et ABCG2 semblent être importants au niveau clinique (Polgar *et al.* 2005). Ces trois protéines sont exprimées chez l'homme non seulement dans des cellules tumorales, mais également dans des tissus importants pour l'absorption (poumons et intestin), pour le métabolisme (foie et reins), ainsi que pour la protection (barrières hématoencéphalique, sang-testicules et materno-fœtale). En plus de leur rôle dans la résistance cellulaire aux drogues, ces protéines pourraient donc moduler l'absorption, la distribution, le métabolisme, l'excrétion et donc la toxicité des xénobiotiques (Leslie *et al.* 2005).



**Figure 7. Topologie prédite pour ABCC1 (A), ABCB1 (B) et ABCG2 (C).** MSD : domaine transmembranaire (*Membrane Spanning Domain*) ; NBD : domaine nucléotidique (*Nucleotide Binding Domain*). Comparé à ABCB1 et ABCC1, ABCG2 montre une topologie inversée NBD-MSD. ABCC1 contient un domaine MSD additionnel du côté N-terminal. Image tirée de Leslie *et al.* (2005).

<sup>3</sup> [www.genenames.org/genefamily/abc.html](http://www.genenames.org/genefamily/abc.html)

Il faut à ce stade souligner qu'il existe d'autres transporteurs en dehors de la famille ABC capables d'exporter des drogues : il s'agit de transporteurs secondaires dépendants du gradient électrochimique de protons ou de sodium (Paulsen *et al.* 1996; Putman *et al.* 2000b). Cependant, ces transporteurs secondaires semblent jouer un rôle important dans les phénotypes MDR plutôt chez les procaryotes, comme discuté dans la section suivante. Par ailleurs, d'autres mécanismes peuvent engendrer ou contribuer à une résistance multiple aux drogues, outre l'expulsion ; ce sont par exemple la modification et inactivation du pharmacophore (Tew *et al.* 1999), la réparation des cibles affectées par la drogue (McHugh *et al.* 2001) ou une survie accrue par blocage de l'apoptose (Lowe *et al.* 1993; Hannun 1997). En effet, les mécanismes d'efflux et de détoxification enzymatique agissent probablement de façon synergique, les pompes à efflux évitant une concentration trop élevée de drogue qui pourrait saturer les systèmes enzymatiques de détoxification, tandis que les modifications chimiques des drogues par ces derniers augmentent généralement l'amphiphilicité des drogues en les transformant en meilleurs substrats pour les pompes (Van Bambeke *et al.* 2000).

### *La résistance à de multiples antibiotiques et les pompes à efflux bactériennes*

Le phénomène MDR est tout aussi considérable chez les procaryotes, où la résistance croisée aux antibiotiques représente un problème majeur de santé publique. Le développement de résistance multiple chez les pathogènes *Streptococcus pneumoniae* (Whitney *et al.* 2000; Klugman 2001; Van Bambeke *et al.* 2007), *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium tuberculosis* (Bloom *et al.* 1992; Chu *et al.* 1996) représente un défi majeur pour la recherche d'antibiotiques. Dans une étude menée au Japon en 1992, plus de 60% des souches de *S.aureus* isolées dans les hôpitaux étaient résistantes à la méthicilline (Yokota 1996). 68% de celles-ci étaient également résistantes à d'autres antibiotiques, de telle sorte que seule la vancomycine pouvait être efficace dans le traitement de ces infections. De façon attendue, le développement de résistance à cet antibiotique est déjà détectable (Chu *et al.* 1996). Dans le cas des infections par le pneumocoque, les sérotypes le plus fréquemment retrouvés depuis l'utilisation d'antibiotiques sont généralement moins virulents mais résistants à de multiples antibiotiques (Whitney *et al.* 2000). Ceci les rend capable de se disséminer davantage et de causer la mort de patients affaiblis par des maladies, le tabac ou l'infection par le HIV. De façon inquiétante, une étude récente prédit que les pneumocoques résistants à de multiples drogues dépasseront au cours de la présente décennie le nombre des souches résistantes à un seul antibiotique (McCormick *et al.* 2003). Quelques données sur la résistance aux antimycobactériens chez *M. tuberculosis* sont rassemblées dans l'annexe B (« Traitement de la tuberculose »).

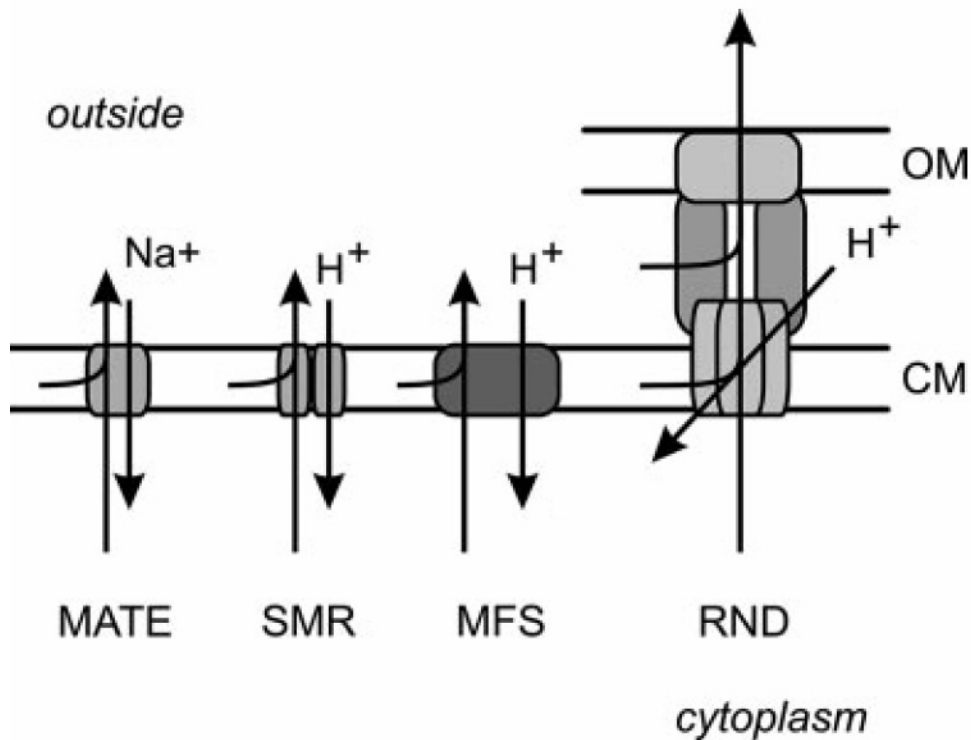
La résistance aux antibiotiques fut reliée pour la première fois à une activité d'efflux en 1980, où les premiers transporteurs d'antibiotiques furent identifiés lors de l'étude de souches résistantes aux tétracyclines (McMurry *et al.* 1980). Jusque là, la modification de la cible ou de

la surface de la cellule modifiant sa perméabilité, ainsi que l'inactivation de l'antibiotique étaient considérées comme les mécanismes majeurs responsables des résistances observées. D'autres transporteurs ont été découverts ensuite en rapport avec la résistance aux macrolides (Ross *et al.* 1990), aux fluoroquinolones (Yoshida *et al.* 1990), aux  $\beta$ -lactames (Li *et al.* 1994) et plus récemment aux aminoglycosides (Aires *et al.* 1999).

L'analyse des génomes microbiens séquencés a révélé la présence d'un nombre élevé de transporteurs putatifs de drogues, au même titre chez des bactéries pathogènes et non pathogènes, et pouvant représenter jusqu'à 18% de l'ensemble des transporteurs (Paulsen *et al.* 1998). Les organismes les plus riches en systèmes d'efflux de drogues seraient des bactéries du sol comme *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Deinococcus radiodurans*, ainsi qu'*E. coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, des organismes intracellulaires tels que *M. tuberculosis* et *Rickettsia prowazekii* ont également un large arsenal de transporteurs putatifs de drogues (Paulsen *et al.* 2001). Toutefois, des études fonctionnelles manquent dans la plupart des cas pour attribuer un vrai phénotype MDR à ces transporteurs. Dans le cas d'*Enterococcus faecalis*, une étude systématique montrait que la délétion de seulement 4 des 31 pompes putatives avait un effet significatif sur l'efflux de drogues (Davis *et al.* 2001). Sur une collection de ~4000 souches d'*E. coli*, chacune ayant un gène différent inactivé (Baba *et al.* 2006), la délétion d'une seule des 37 pompes à efflux prédites MDR, notamment AcrAB, semble donner lieu à un phénotype d'hypersensibilité aux antibiotiques étudiés (Tamae *et al.* 2008).

A la différence des eucaryotes, la majorité des pompes à efflux de drogues décrites dans un premier temps chez les procaryotes étaient des transporteurs secondaires, à tel point que l'existence de transporteurs MDR primaires chez les bactéries était contestée. Il fallut attendre 1996 pour la description du premier transporteur ABC bactérien de multiples drogues, LmrA de *Lactococcus lactis* (van Veen *et al.* 1996). En fonction de la topologie et l'homologie de séquence, 4 familles de transporteurs secondaires ont été identifiées chez les procaryotes. Ils agissent en tant qu'antiporteurs substrat/proton ou substrat/Na<sup>+</sup> (cf. fig. 8) : MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*; Brown *et al.* 1999), SMR (*Small Multidrug Resistance*; Paulsen *et al.* 1996b), MFS (*Major Facilitator Superfamily*; Marger *et al.* 1993) et RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*; Saier *et al.* 1994). Parmi ces familles on retrouve également des protéines impliquées dans le transport de substrats autres que les drogues, tel que des sucres et des métabolites intermédiaires du cycle de Krebs (Putman *et al.* 2000b).

**Figure 8. Représentation schématique des principales familles de transporteurs MDR secondaires chez les procaryotes.** Modifié à partir de Lubelski *et al.* (2007). MATE: *Multidrug And Toxic compound Extrusion*; SMR: *Small Multidrug Resistance*; MFS: *Major Facilitator Superfamily*; RND: *Resistance-Nodulation-cell Division*. OM: membrane externe, CM: membrane cytoplasmique.



Parmi l'ensemble des transporteurs MDR putatifs révélés par l'analyse des génomes bactériens, deux familles majoritaires se profilent : les transporteurs ABC et la famille MFS. Cependant, des exceptions sont à noter : Les archées, par exemple, semblent utiliser de façon majoritaire les systèmes MFS, aucun transporteur ABC MDR n'a été identifié jusqu'à présent dans ces organismes. Au contraire, les mycoplasmes et *Thermotoga maritima* sont largement ou entièrement dépendants des systèmes ABC, ce qui pourrait s'expliquer par l'absence de cycle de Krebs et de chaîne respiratoire dans ces organismes (Paulsen *et al.* 2001). Les protéines de la famille SMR ne semblent être présentes que chez une minorité d'organismes et en nombre réduit. Quant à la famille MATE, malgré une distribution phylogénétique large, elle ne représente qu'une petite fraction des systèmes à efflux présents chez un organisme donné (Paulsen *et al.* 2001). Les membres de la famille RND sont abondants chez les bactéries à Gram -, en accord avec leur capacité d'assurer le transport de substrats à travers deux membranes grâce à l'interaction avec des protéines de la membrane externe et du périplasma (cf. fig. 8). Cette capacité de transport à travers les deux membranes des bactéries à Gram - est également partagée, mais de façon plus ponctuelle, par des membres de la famille MFS et des transporteurs ABC, toujours en fonctionnement étroit avec une protéine périplasmique et une protéine de la membrane externe apparentée à TolC (Paulsen *et al.* 1997; Kobayashi *et al.* 2001).

## Transporteurs ABC MDR chez les procaryotes

Parmi les transporteurs ABC bactériens capables d'exporter des antibiotiques, on en distingue deux types en fonction de la spécificité de substrat, i.e. restreinte ou large. Le premier type se trouve principalement chez les organismes producteurs d'antibiotiques. Ceux-ci possèdent souvent des transporteurs ABC capables de rejeter hors de la cellule l'antibiotique produit et de conférer ainsi à la bactérie la résistance nécessaire. C'est le cas notamment des streptomycètes, qui synthétisent à peu près trois quarts des antibiotiques connus (Mendez *et al.* 2001). Il s'agit de transporteurs avec une spécificité de substrat limitée généralement à l'antibiotique produit (cf. tableau 2). Plusieurs architectures de transporteur sont possibles : domaines nucléotidiques et transmembranaires portés par des polypeptides différents (type I) ou fusionnés dans une protéine TMD-NBD qui constitue un demi-transporteur (type III). Les protéines classées dans le type II constituent un cas particulier : elles sont constituées de deux domaines nucléotidiques fusionnés dans un seul polypeptide (souvent appelées NBD<sub>2</sub> ; Kerr *et al.* 2005) et les domaines transmembranaires sont absents.

Antibiotique synthétisé <sup>1</sup>	Famille d'antibiotiques	Organisme producteur*	Protéine de liaison de nucléotide	Protéine membranaire
<i>Type I</i>				
Daunorubicine	anthracènedione	<i>S. peucetius</i>	DrrA	DrrB
Mithramycine	acide auréolique	<i>S. argillaceus</i>	MtrA	MtrB
Oleandomycine	macrolide	<i>S. antibioticus</i>	OleC	OleC5
Tétronasine	ionophore	<i>S. longisporoflavus</i>	TnrB2	TnrB3
Macrotétrolide	ionophores	<i>S. griseus</i>	Non-orf5	Non-orf6
Kasugamycine	aminoglycoside	<i>S. kasugaensis</i>	KasK	KasL, KasM
Rapamycine	macrolide	<i>S. hygroscopicus</i>	OrfX	–
<i>Type II</i>				
Carbomycine	macrolide	<i>S. thermotolerans</i>	CarA	–
Spiramycine	macrolide	<i>S. ambofaciens</i>	SrmB	–
Tylosine	macrolide	<i>S. fradiae</i>	TlrC	–
Oléandomycine	macrolide	<i>S. antibioticus</i>	OleB	–
A201A	aminonucléoside	<i>S. capreolus</i>	Ard1	–
Lincomycine	lincosamide	<i>S. lincolnensis</i>	LmrC	–
Frénolicine	polykétide	<i>S. roseofulvus</i>	FnrD	–
Virginiamycine	streptogramine	<i>S. virginiae</i>	VarM	–
<i>Type III</i>				
Bléomycine	glycopeptide	<i>Stv. verticillium</i>		Ble-Orf7**
Streptomycine	aminoglycoside	<i>S. glaucescens</i>		StrV, StrW**
Chloroeremomycine	glycopeptide	<i>A. orientalis</i>		Orf2**
Novobiocine	aminocoumarins	<i>S. sphaeroides</i>		NovA**
Nystatine	macrolide polyène	<i>S. noursei</i>		NysG, NysH**

**Tableau 2. Transporteurs ABC dans des actinomycètes producteurs d'antibiotiques.** Extrait de Mendez *et al.* (2001). <sup>1</sup>Les structures chimiques de quelques antibiotiques sont présentées dans les annexes A et B. \*A.: Amycolatopsis; S.: Streptomyces; Stv.: Streptovorticillum. \*\*Les transporteurs de type III sont des homo- ou hétérodimères : un domaine nucléotidique et un domaine transmembranaire sont fusionnés dans une seule protéine, constituant un demi-transporteur.

**Tableau 3. Protéines NBD<sub>2</sub> de la famille ARE caractérisées dans des bactéries Gram + non productrices d'antibiotiques.** EB : bromure d'éthidium ; LM : lincomycine ; VM, virginiamycine M. \* cf. Annexes A, B et D pour les structures de ces composés.

Organisme	Protéine	Substrats décrits*	Références
<i>Bacillus subtilis</i>	VmlR (ExpZ)	VM, LM	Ohki <i>et al.</i> 2005
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lsa	streptogramines type A et lincosamine	Singh <i>et al.</i> 2002
<i>Enterococcus faecium</i>	MsrC	streptogramines type B et macrolides	Portillo <i>et al.</i> 2000
<i>Staphylococci</i>	VgaA, VgaA(v), VgaB	streptogramines type A	Allignet <i>et al.</i> 1992; Allignet <i>et al.</i> 1997; Haroche <i>et al.</i> 2000
	MsrA	streptogramines type B et macrolides	Ross <i>et al.</i> 1995

Un certain nombre de protéines homologues NBD<sub>2</sub> ont été identifiées chez d'autres bactéries Gram + non productrices d'antibiotiques (cf. tableau 3), résultat vraisemblable du transfert horizontal des gènes des protéines de type II répertoriés dans le tableau 2. Ces protéines NBD<sub>2</sub> semblent conférer une résistance aux antibiotiques Macrolides, Lincosamides et/ou Streptogramines (MLS ; Chesneau *et al.* 2005) et, dans le répertoire des protéines ABC, ont été classées dans une sous-famille spécifique nommée ARE pour *antibiotic resistance* (Bouige *et al.* 2002; Davidson *et al.* 2008). Un cas particulier parmi ces ATPases dimériques est la protéine CmpA de *Clostridium hathewayi*, récemment identifiée (Rafii *et al.* 2008). Malgré l'homologie avec les protéines ARE, CmpA semble capable de conférer une résistance aux fluoroquinolones, qui n'appartiennent pas aux substrats typiques de ce groupe. De plus, un domaine transmembranaire, CmpB, aurait été identifié à proximité, quoique son implication dans la résistance ne soit pas assez étayée.

Comment les protéines ARE peuvent-elles conférer une résistance aux antibiotiques en absence de domaines transmembranaires ? Ces protéines pourraient constituer un système d'export en s'associant à des domaines transmembranaires qui n'ont pas encore été identifiés ou qui seraient partagés avec d'autres systèmes ABC. L'autre hypothèse pour expliquer la résistance conférée aux antibiotiques s'éloigne du paradigme d'export et propose à la place un rôle protecteur de ces protéines sur les ribosomes, qui constituent notamment les cibles des antibiotiques MLS (Kerr *et al.* 2005).

L'autre grand groupe de transporteurs ABC bactériens d'antibiotiques est capable de reconnaître une plus grande diversité de substrats, de façon comparable à leurs homologues ABC MDR humains. Les transporteurs appartenant à ce groupe ayant été caractérisés au niveau cellulaire et/ou moléculaire sont listés dans le tableau 4. Plusieurs aspects intéressants ressortent de l'analyse de ces transporteurs :



- ∞ Le domaine nucléotidique (NBD) et transmembranaire (TM) sont généralement fusionnés dans une même protéine. Les transporteurs de *M. tuberculosis* Rv2686 (TM)-Rv2687(TM)-Rv2688(NBD) et DrrA(NBD)-DrrB(TM) (avec son homologue chez *S. rochei*) constituent les seules exceptions caractérisées jusqu'à présent.
- ∞ La topologie majoritaire est l'homodimère (TM-NBD)<sub>2</sub>, même si un nombre important d'hétérodimères est à souligner (6 sur 19). Seulement un transporteur avec une topologie type ABCB1 (les quatre domaines fusionnés dans un seul polypeptide, cf. fig. 7) a été décrit : Rv0194 chez *M. tuberculosis* ; et un cas de topologie type ABCG (NBD-TM)<sub>2</sub> : MacB.
- ∞ La capacité de reconnaître et transporter de multiples drogues observée chez ces protéines ABC s'avère dans quelques cas d'importance physiologique. Les transporteurs ABC (et non seulement les transporteurs secondaires, comme il avait été postulé) peuvent être les responsables principaux d'un phénotype MDR (intrinsèque ou acquis) chez les bactéries. Ainsi, la délétion des gènes codant pour 30 pompes MDR putatives chez *E. faecalis* a permis d'identifier 4 transporteurs impliqués dans la résistance de cette bactérie à des antibiotiques, tous appartenant à la famille ABC (cf. tableau 4 ; Davis *et al.* 2001). De la même manière, le transporteur hétérodimérique LmrC/LmrD est impliqué en tant qu'acteur majeur dans la résistance de *L. lactis* à plusieurs composés toxiques (Lubelski *et al.* 2006a). La même observation a été faite dans le cas de SP2073/SP2075 (nommé également PatA/PatB) chez *S. pneumoniae* (Robertson *et al.* 2005; Marrer *et al.* 2006; Garvey *et al.* 2008).

Par ailleurs, il faut admettre que la frontière entre les transporteurs ABC d'antibiotiques de spécificité restreinte (cf. tableau 2 et 3) et ceux de spécificité vaste (cf. tableau 4) n'est pas forcément nette. Ainsi, alors que DrrA/DrrB chez *S. peucetius* est responsable de la résistance aux antibiotiques produit par cette bactérie (doxo- et daunorubicine), son homologue chez *M. tuberculosis* semble reconnaître un nombre important de composés non apparentés (Choudhuri *et al.* 2002). De la même manière, l'homologue chez *S. rochei* (qui n'est pas producteur de doxo- ou daunorubicine) est capable de conférer un phénotype MDR (Fernandez-Moreno *et al.* 1998). D'un autre côté, on retrouve chez *E. coli* un transporteur spécifique de macrolides, MacB (Kobayashi *et al.* 2001), alors que cette bactérie n'est pas productrice de ce type d'antibiotiques.

	Organisme	Transporteur	Topologie prédite *	Substrats décrits <sup>1</sup>	Références
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	BmrA (YvcC)	(TM-NBD) <sub>2</sub>	AD, DO, EB, H	Steinfels <i>et al.</i> 2002; Steinfels <i>et al.</i> 2004
	<i>Bifidobacterium breve</i>	AbcA / AbcB	TM-NBD / TM-NBD	H, nisine, polymyxine B	Margolles <i>et al.</i> 2006
	<i>Enterococcus faecalis</i>	EfrA / EfrB	TM-NBD / TM-NBD	AC, EB, SO, DAPI, DA, DO, NB, AK, DC, NF	Lee <i>et al.</i> 2003
		Abc7	(TM-NBD) <sub>2</sub>	DA, DO, EB, OF, CM	Davis <i>et al.</i> 2001
		Abc11	(TM-NBD) <sub>2</sub>	PT, CH	
		Abc16	(TM-NBD) <sub>2</sub>	AZ, EM, CR,	
		Abc23	(TM-NBD) <sub>2</sub>	CL, LM, VM, SC	
	<i>Lactobacillus brevis</i>	HorA	(TM-NBD) <sub>2</sub>	EB, H, iso- $\alpha$ -acides du houblon	Sakamoto <i>et al.</i> 2001
	<i>Lactococcus lactis</i>	LmrA	(TM-NBD) <sub>2</sub>	DA, EB, H, R6G, TPP, divers antibiotiques	van Veen <i>et al.</i> 1996; Putman <i>et al.</i> 2000a
		LmrC / LmrD	TM-NBD / TM-NBD	DA, EB, H, R6G, CHO, BCECF-AM	Lubelski <i>et al.</i> 2004
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	DrrA / DrrB	NBD <sub>2</sub> / TM <sub>2</sub>	BCECF-AM, DA, DO, EB, TC, EM, NF, CM, ST	Choudhuri <i>et al.</i> 2002
		Rv2686c/Rv2687c / Rv2688c	TM/ TM/ NBD <sub>2</sub>	CF, NF, moxifloxacin, sparfloracin	Pasca <i>et al.</i> 2004
		Rv0194	TM-NBD-TM-NBD	AM, CM, EB, ST, TC	Danilchanka <i>et al.</i> 2008
	<i>Oenococcus oeni</i>	OmrA	(TM-NBD) <sub>2</sub>	SL, CdCl <sub>2</sub>	Bourdineaud <i>et al.</i> 2004; Achard-Joris <i>et al.</i> 2005
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sav1866	(TM-NBD) <sub>2</sub>	H, EB	Velamakanni <i>et al.</i> 2008
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SP2073 / SP2075	TM-NBD / TM-NBD	AC, BB, EB, CF, NF, NB, CL	Robertson <i>et al.</i> 2005; Marrer <i>et al.</i> 2006; Garvey <i>et al.</i> 2008
	<i>Streptomyces rochei</i>	msr ORF1/2	NBD <sub>2</sub> /TM <sub>2</sub>	DO, EM, OL, TC, SP	Fernandez-Moreno <i>et al.</i> 1998
Gram -	<i>Mycoplasma hominis</i>	MD1/MD2	TM-NBD / TM-NBD	(EB, CF)	Raherison <i>et al.</i> 2005
	<i>Escherichia coli</i>	MsbA	(TM-NBD) <sub>2</sub>	EB, ERY, H, lipide A	Woebking <i>et al.</i> 2005
		MacB	(NBD-TM) <sub>2</sub>	macrolides	Kobayashi <i>et al.</i> 2001
	<i>Serratia marcescens</i>	SmdA / SmdB	TM-NBD / TM-NBD	DAPI, H, NF, TC	Matsuo <i>et al.</i> 2008
	<i>Vibrio cholerae</i>	VcaM	(TM-NBD) <sub>2</sub>	H, TC, CF, NF, OF, DA, DO, DAPI, TTP, R6G, EB, AO	Huda <i>et al.</i> 2003

**Tableau 4. Transporteurs ABC bactériens impliqués dans l'efflux de multiples drogues caractérisés au niveau moléculaire et/ou cellulaire.** Modifié et complété à partir de Lubelski *et al.* (2007). \* TM : domaine transmembranaire, NBD : domaine nucléotidique. <sup>1</sup> cf. Annexes A-D pour la structure chimique de ces composés. AC, acriflavine; AD, 7-aminoactinomycine D; AK, arbécacine; AM, ampicilline ; AO, acridine orange; AZ, azithromycine; BB, berbérine; BCECF-AM, acetoxyméthylester 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5-(and 6)-carboxyfluorescéine; CF, ciprofloxacine; CH, chlorhexidine; CHO, sodium cholate; CL, clindamycine; CM, chloramphénicol; CR, clarithromycine; DA, daunomycine (daunorubicine); DC, doxycycline; DO, doxorubicine (adriamycine); EB, bromure d'éthidium; EM, érythromycine; H, Hoechst 33342; LM, lincomycine; NB, novobiocine; NF, norfloxacine; OF, ofloxacine; OL, oléandomycine ; PT, pentamidine; R6G, rhodamine 6G; SC, Synercid; SL, sodium laureate; SO, safranine O; SP, spiramycine ; ST, streptomycine ; TC, tétracyclines; TPP, tetraphénylphosphonium; VM, virginiamycine M.

## *Les mystères des transporteurs de multiples drogues*

Ces observations relatives à la (poly)spécificité de substrat des transporteurs MDR et à leur profusion et diversité nous mènent à deux questions centrales concernant l'évolution des transporteurs de multiples drogues : (i) Comment expliquer une spécificité de substrat tellement large? (ii) Etant donné la surabondance de transporteurs putatifs MDR, l'efflux de drogues est-il leur rôle physiologique majeur? Deux hypothèses alternatives ont été évoquées pour essayer de répondre à ces questions d'un point de vue évolutif (Neyfakh 1997):

1. Les transporteurs de multiples drogues auraient évolué de façon spécifique pour protéger les cellules des différentes toxines environnementales, développant pour ceci une spécificité de substrat large.
2. Les transporteurs MDR possèderaient des substrats physiologiques spécifiques et les drogues ne seraient que des substrats accidentels reconnus à cause de leur similarité structurale et chimique avec les substrats naturels.

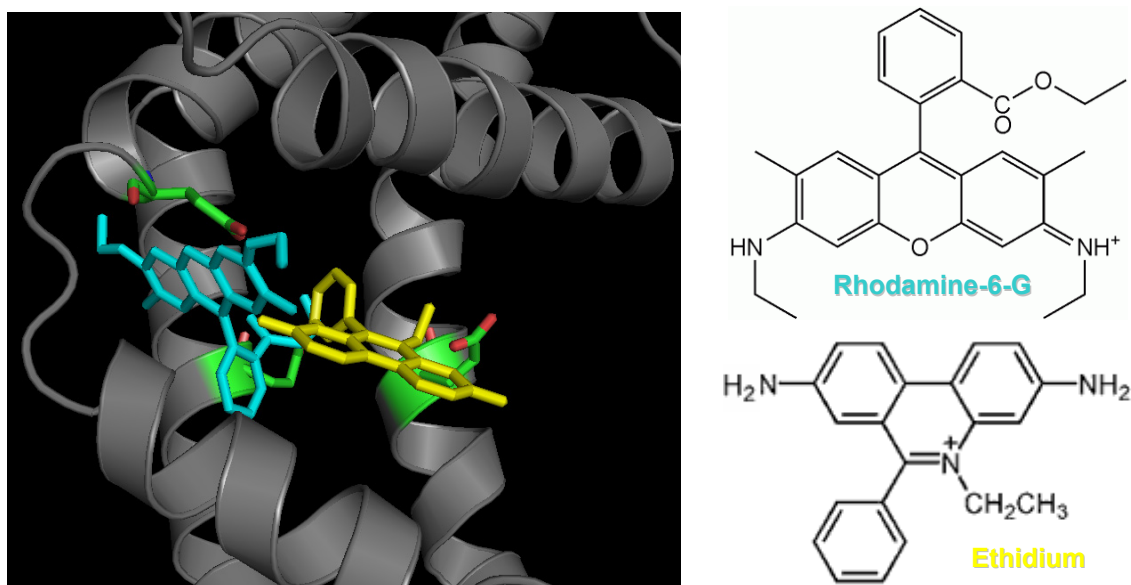
L'argument le plus solide appuyant la première hypothèse concerne la régulation transcriptionnelle de quelques transporteurs de multiples drogues : L'expression de quelques transporteurs est régulée *in vivo* par la présence des xénobiotiques transportés. Des régulateurs transcriptionnels ont été identifiés capables de répondre à ces substrats ou de façon globale à des stress toxiques (e.g. BmrR chez *B. subtilis*; Ahmed *et al.* 1994; Lomovskaya *et al.* 1995). Cette régulation transcriptionnelle par les xénobiotiques serait cohérente avec un rôle dédié des transporteurs de multiples drogues à la protection cellulaire.

Cependant, une évolution spécifique de la capacité à expulser de multiples drogues explique difficilement pourquoi un organisme donné possède un nombre si élevé de transporteurs de multiples drogues, dont la spécificité de substrat est souvent redondante. De plus, une évolution ciblée est contestée par la constatation que la capacité de transporter de multiples drogues est apparue dans plusieurs familles de transporteurs (au moins cinq : ABC, MFS, MATE, RND, SMR), ne possédant pas de motifs de séquence apparentés. Par ailleurs, pour atteindre un niveau d'efflux significatif, la plupart des transporteurs MDR doivent être surexprimés considérablement (Grkovic *et al.* 2002). Ces arguments semblent valider plutôt la seconde hypothèse : le transport de multiples drogues serait une activité secondaire pour ces protéines. Cette hypothèse est également confortée par la proximité, au niveau de leur séquence, entre nombreux transporteurs de multiples drogues et des transporteurs spécifiques d'un substrat. L'exemple de DrrA/DrrB détaillé dans la section précédente est à ce titre significatif: Ces gènes seraient originaires de *S. peucetius*, où ils rendent la bactérie résistante aux antibiotiques produits (dauno- et doxorubicine). Ils auraient ensuite été transférés horizontalement à d'autres organismes (*S. rochei*, *M. tuberculosis*), avec un élargissement concomitant de leur spécificité de substrat (Poole 2005). L'interconversion entre transporteurs spécifiques d'une drogue (ou d'une classe de drogues) et transporteurs de multiples drogues

serait, au moins dans le cas de la famille MFS, relativement « facile » et aurait eu lieu plusieurs fois au cours de l'évolution (Saier *et al.* 1998a).

### La reconnaissance de multiples drogues dévoilée ?

L'étude structurale de régulateurs transcriptionnels tels que QacR de *S. aureus* (Schumacher *et al.* 2001) ou BmrR de *B. subtilis* (Zheleznova *et al.* 1999; Heldwein *et al.* 2001) en complexe avec différentes drogues a révélé les fondements biochimiques de la reconnaissance de multiples drogues. Ces structures ont dévoilé de grandes cavités enfouies essentiellement hydrophobes qui accommodent les substrats (cf. fig. 9), ces poches étant suffisamment larges pour permettre aux ligands d'acquérir diverses orientations et d'interagir avec différents résidus. La force majeure qui dirige la liaison des substrats semble être l'effet hydrophobe. Etant donné que ces protéines ne rentrent pas en concurrence avec les molécules d'eau pour la liaison du substrat hydrophobe, une affinité élevée pour le substrat est atteinte grâce à cette cavité hydrophobe même en absence d'une géométrie parfaitement complémentaire (propre aux modèles « clef/serrure »). Cette affinité peut être encore augmentée avec des contributions électrostatiques dans la poche hydrophobe. Des charges négatives se trouvent notamment souvent dans la cavité (cf. fig. 9), contribuant de façon non négligeable à la liaison de drogues (positivement chargées) du fait que les interactions électrostatiques sont spécialement fortes dans un environnement hydrophobe.



A la différence de ce qui caractérise la reconnaissance de ligands hydrophiles, la (poly)spécificité de substrat chez les protéines MDR ne résulte pas d'une adaptation parfaite du substrat dans son site de fixation, mais plutôt de la géométrie du site de liaison et de son hydrophobicité : toute molécule hydrophobe capable de s'accommoder dans la cavité sans laisser entrer des molécules d'eau est susceptible de se lier à la protéine (Neyfakh 2002). La grande cavité peut même héberger simultanément plus d'un substrat, comme montré pour QacR, cristallisé avec la proflavine et l'éthidium fixés ensemble dans le site de liaison (Schumacher *et al.* 2004). Cette possibilité expliquerait plusieurs observations cumulées lors de l'étude des transporteurs MDR ABC : (i) la liaison compétitive et non-compétitive de différentes drogues sur un transporteur ; (ii) la stimulation du transport d'une drogue par la liaison d'une autre ; (iii) la titration de deux molécules de drogue liées par molécule de transporteur (Higgins 2007).

Si l'on suppose que ce paradigme architectural des sites de liaison est en effet extensible aux transporteurs, il expliquerait que la capacité de lier de multiples drogues puisse être apparue plusieurs fois au cours de l'évolution et pourquoi des transporteurs non apparentés sont capables de reconnaître des spectres recouvrants de substrats. Il n'y a probablement pas une forte pression sélective pour que les transporteurs deviennent plus spécifiques dans le transport de molécules hydrophobes, sachant que le nombre de ces molécules présentes dans le cytoplasme (e.g. vitamines ou précurseurs de lipides) est très réduit et qu'elles sont souvent complexées à d'autres protéines qui évitent leur diffusion vers l'extérieur de la cellule.

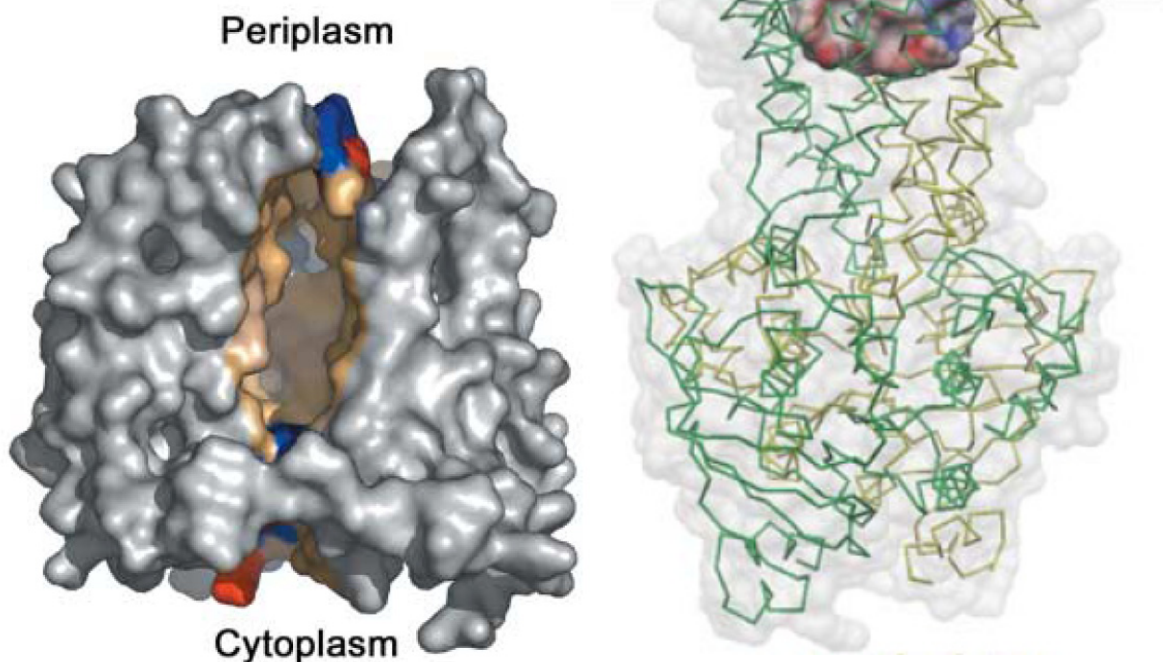
Mais, que sait-on sur les sites de liaison des transporteurs MDR ? A l'heure actuelle, on dispose de structures atomiques de deux transporteurs de multiples drogues en complexe avec des substrats : AcrB et EmrE (les deux à partir d'*E. coli*), appartenant à la famille RND et SMR, respectivement. Pour le transporteur dimérique EmrE, la structure en présence de tetraphénylphosphonium (TPP) a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Chen *et al.* 2007) et cryomicroscopie électronique (Ubarretxena-Belandia *et al.* 2003). D'autres données structurales en complexe avec l'éthidium, le propidium et le dequalinium ont été obtenues par cryomicroscopie électronique de cristaux 2D (Korkhov *et al.* 2008). Toutes ces structures montrent une cavité entre les deux sous-unités du transporteur qui héberge les différents substrats, le mécanisme de transport proposé étant un accès alternatif des deux côtés de la membrane. La position du substrat est déterminée sans ambiguïté, à mi-hauteur par rapport à la membrane. Par contre il n'est pas possible d'assigner avec précision la composition en acides aminés du site de liaison, la meilleure résolution obtenue étant à 4 Å. Les données structurales obtenues par le groupe de Tate révèlent que les 4 substrats étudiés se fixent dans la même position, mais que les hélices formant la cavité subissent des réarrangements conformationnels suite à la liaison de substrat.

Le transporteur trimérique AcrB suit probablement un mécanisme de transport assez différent, les substrats sembleraient être recrutés au niveau de la face périplasmique de la

membrane et ensuite transférés à la protéine TolC. Par contre, la poche de liaison de substrat (une dans chacune des trois sous-unités) rappelle les caractéristiques observées chez QacR et BmrR : elle est très riche en résidus aromatiques et possède quelques résidus polaires qui pourraient interagir avec les drogues chargées (Murakami *et al.* 2006).

D'autres informations intéressantes proviennent de la structure 3D d'un autre transporteur de multiples drogues d'*E. coli*, cette fois-ci de la famille MFS, EmrD, obtenue en absence de substrat (Yin *et al.* 2006). Cette structure révèle une grande cavité largement hydrophobe (cf. fig. 10) qui est essentiellement fermée aux côtés cyto- et periplasmique, représentant probablement un état intermédiaire dans le cycle de transport. De façon intéressante, les transporteurs de lactose LacY et de glycérol-3-phosphate GlpT, appartenant à la même famille MFS, présentent des cavités intérieures hydrophiles, en accord avec la nature polaire de leurs substrats.

**Figure 10. A gauche : Section de la structure du transporteur EmrD montrant la cavité hydrophobe interne.** Le degré d'hydrophobicité est représenté par une gradation de marron claire (hydrophobicité modérée) à marron foncé (hydrophobicité élevée). Les régions positive- et négativement chargées sont montrées en bleu et rouge, respectivement. Figure extraite de Yin *et al.* (2006). **A droite : Structure du transporteur Sav1866 montrant la cavité centrale colorée en fonction du potentiel électrostatique de surface** (bleu : positivement chargé ; rouge : négativement chargé). Figure extraite de Dawson *et al.* (2006).



En ce qui concerne les transporteurs ABC de multiples drogues, la seule structure publiée en présence de substrat (MsbA d'*E. coli*, qui est apparenté aux MDR (Reuter *et al.* 2003; Woebking *et al.* 2005), en complexe avec du lipide A) a été par la suite rétractée à cause d'une erreur dans le traitement des données de diffraction (Chang *et al.* 2006). Plusieurs structures de transporteurs ABC MDR ont été obtenues, mais en absence de drogues : avec une résolution entre 3 et 5 Å pour les transporteurs Sav1866 et MsbA (cf. tableau 1) et avec une résolution de 10 Å pour la glycoprotéine-P (Rosenberg *et al.* 2001b). Ces structures révèlent de larges cavités qui sont ouvertes vers la membrane et orientées vers le cytoplasme ou vers l'extérieur en fonction de la conformation stabilisée dans le cristal.

L'ouverture de la cavité interne vers la membrane observée dans ces structures 3D pourrait permettre l'entrée latérale de substrats incorporés dans la membrane. De nombreuses données biochimiques semblent appuyer ce modèle de recrutement de substrats par les transporteurs ABC, où ils agiraient en tant qu'aspirateurs de molécules hydrophobes présentes dans la membrane (modèle « vacuum cleaner »).

Concernant la nature du site de liaison de substrat, les structures de Sav1866 en absence de substrat (avec ADP ou AMPPNP liés dans les sites nucléotidiques) montrent une cavité largement hydrophile (cf. fig. 10) et ouverte vers l'extérieur. D'après les auteurs, elle pourrait représenter une voie d'extrusion de substrat avec une affinité négligeable pour celui-ci (Dawson *et al.* 2007a). Par ailleurs, des études dynamiques ont été réalisées sur la glycoprotéine-P (Loo *et al.* 2004), LmrA (Poelarends *et al.* 2002) et MsbA (Dong *et al.* 2005). Ces études sont basées sur le marquage sélectif de résidus mutés en cystéine avec des réactifs hydrosolubles, incapables de pénétrer dans la phase membranaire. Les résultats corroborent la présence dans ces trois transporteurs, en absence de nucléotide et de substrat, d'une cavité ouverte vers le cytoplasme et accessible à l'eau. De plus, le groupe de Mchaourab a montré que, en présence d'AMPPNP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, MsbA subit un changement de conformation global qui entraîne une occlusion de la cavité. Ils proposent que les propriétés diélectriques de la cavité sont symétrisées par cette fermeture, ce qui pourrait être la force motrice pour la translocation de substrat (lipide A dans le cas du transporteur MsbA).

Ces différentes observations semblent indiquer que le modèle de reconnaissance de multiples drogues prévoyant une large poche flexible pourrait être applicable aux transporteurs ABC MDR. L'hydrophobicité de cette poche reste néanmoins à démontrer. L'obtention de nouvelles données structurales de transporteurs ABC de multiples drogues en complexe avec des substrats contribuera certainement à compléter notre compréhension de la reconnaissance de ligands par ce type de transporteurs.

### **D'autres rôles physiologiques pour les transporteurs de multiples drogues ?**

Le nombre imposant de transporteurs putatifs de multiples drogues dans les génomes séquencés, la polyspécificité de substrat (y compris de molécules non retrouvées dans

l'environnement physiologique), l'expression basale de certains de ces transporteurs, la persistance des gènes codant pour des transporteurs d'antibiotiques en absence de pression sélective... ces observations interpellent la communauté scientifique sur le rôle physiologique des transporteurs de multiples drogues.

Chez l'homme, comme évoqué précédemment, les transporteurs ABC MDR semblent avoir une fonction basale protectrice, contrôlant le passage de xénobiotiques à travers les barrières épithéliales (Leslie *et al.* 2005). En effet, les souris délétées de la glycoprotéine-P n'ont pas de phénotype particulier, sauf l'altération des propriétés pharmacocinétiques et la sensibilité à des neurotoxines qui normalement ne peuvent pas traverser la barrière hématoencéphalique (Schinkel *et al.* 1995). Par contre, dans la même sous-famille ABCB, le transporteur humain MDR3 (ABCB4) et le transporteur Mdr2 de souris sont des « flippases » de phosphatidylcholine (Ruetz *et al.* 1994; van Helvoort *et al.* 1996). De même, des substrats physiologiques en dehors des drogues ont été identifiés pour plusieurs transporteurs MRP, e.g. leucotriènes et oestradiol dans le cas d'ABCC1 (Keppler *et al.* 1997) ou sels biliaires pour ABCC3 (Hirohashi *et al.* 2000).

Chez les bactéries, plusieurs éléments ont permis d'attribuer à certains transporteurs identifiés initialement comme MDR des rôles physiologiques complémentaires ou différents de la protection cellulaire face aux drogues. Comme ABCB4, le transporteur ABC MsbA d'*E. coli* fonctionne *in vivo* en tant que flippase de lipides, notamment de précurseurs de lipide A, ainsi que de la phosphatidyléthanolamine (Doerrler *et al.* 2004). Un exemple typique est fourni par l'étude des transporteurs MFS Blt et Bmr de *B. subtilis*, qui montrent 51% d'identité de séquence et possèdent une spécificité très similaire pour les drogues (Ahmed *et al.* 1995). Néanmoins, les différences dans leur profil transcriptionnel permirent l'identification ultérieure de la spermidine comme substrat physiologique de Blt, résolvant ainsi le paradoxe de la redondance apparente de Blt/Bmr (Woolridge *et al.* 1997).

Par ailleurs, pour deux transporteurs secondaires, MdfA d'*E. coli* et Tet(L) de *B. subtilis*, un rôle a été proposé dans la régulation du pH interne de la bactérie ; ces transporteurs fonctionneraient comme antiporteurs  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{H}^+$  et interviendraient dans la tolérance au pH alcalin de ces bactéries (Cheng *et al.* 1994; Lewinson *et al.* 2004). Finalement, de multiples résultats suggèrent que les transporteurs MDR bactériens pourraient être impliqués dans la pathogénicité microbienne et la survie des bactéries dans leur environnement (Piddock 2006), grâce notamment à la capacité d'exporter des substances tels que:

- les antimicrobiens synthétisés par l'hôte (flavonoïdes, isoprenoïdes et alcaloïdes végétaux, ainsi que sels biliaires ou peptides antimicrobiens animaux comme les défensines)
- les antimicrobiens synthétisés par d'autres microorganismes présents dans la même niche écologique
- les facteurs de virulence, tels que des adhésines, des toxines ou d'autres protéines importantes pour la colonisation et l'infection

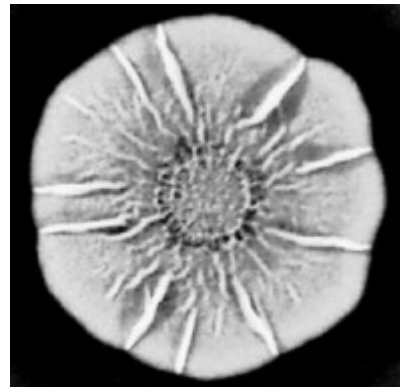


## LA BACTERIE *BACILLUS SUBTILIS*

*Bacillus subtilis* est une bactérie à Gram positif non pathogène qui peut être isolée dans des environnements assez différents, tel que le sol, les racines végétales ou les conduits intestinaux animaux (Earl *et al.* 2008). Cet organisme a été étudié depuis plus d'un siècle, la facilité à le manipuler génétiquement en est une des raisons principales. La souche de laboratoire *B. subtilis* 168 a été la première bactérie à Gram + dont le génome a été séquencé (Kunst *et al.* 1997) ; son génome a été publié la même année que celui de la bactérie Gram - *Escherichia coli* K-12 (Blattner *et al.* 1997). *B. subtilis* constitue la bactérie modèle des Gram +, tout comme *E. coli* pour les Gram -.

*B. subtilis* montre une capacité d'adaptation remarquable, lui permettant d'habiter des environnements très différents et de survivre à des carences et des stress importants. Le temps de génération de cette bactérie peut passer de 50-100 heures dans le sol à 20-30 minutes dans les conditions de laboratoire (Hecker *et al.* 1990). Cette plasticité intéresse et interpelle amplement la communauté scientifique et plusieurs aspects de la physiologie de *Bacillus* sont aujourd'hui le sujet d'étude intense, en voici quelques exemples :

- ∞ la capacité de sporulation en réponse à des stress nutritionnels et environnementaux
- ∞ la formation de « biofilms » (cf. fig. 11) et le comportement « pluricellulaire »
- ∞ les phénomènes de différenciation cellulaire et de communication intercellulaire sous-jacents à ces processus, ainsi que les mécanismes senseurs des conditions extérieures
- ∞ la production d'antibiotiques
- ∞ la compétence naturelle, c'est-à-dire la capacité d'incorporer de l'ADN extracellulaire (à des fins nutritionnels et de recombinaison génétique)
- ∞ finalement, le genre *Bacillus* a acquis plus récemment un intérêt médical de premier ordre avec la menace que représente l'utilisation de l'espèce *B. anthracis* pour le bioterrorisme

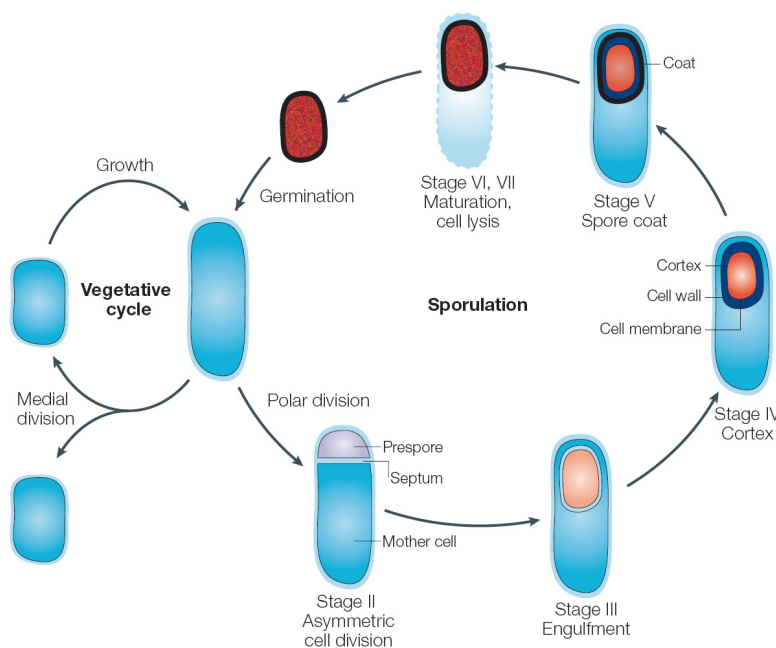


**Figure 11. Architecture d'une colonie de la souche sauvage *B. subtilis* NCIB3610, montrant la formation d'un biofilm.** Tiré de Branda *et al.* (2001).

## La sporulation

D'un intérêt particulier pour notre étude est le comportement de *B. subtilis* face au stress nutritionnel. De façon à peu près générale, en réponse au stress nutritionnel, les bactéries adoptent un état physiologique caractérisé par une dégradation protéique accrue, une diminution de la synthèse d'acides nucléiques et des protéines et une augmentation de la synthèse d'acides aminés. Ce changement global du métabolisme cellulaire, visant une épargne d'énergie, est appelé « réponse stringente ». Dans le cas des bactéries capables de former des spores comme *B. subtilis*, cette réponse peut aboutir à la sporulation, qui est un programme de différenciation cellulaire très élaboré qui dure 6-8 heures et implique l'expression de plus de 500 gènes (Ellermeier *et al.* 2006). Le résultat de la sporulation est une cellule dormante (spore ou endospore, cf. fig. 12) capable de supporter des conditions environnementales extrêmes pendant plusieurs années et devenir à nouveau active (processus appelé germination) quand les conditions extérieures redeviennent favorables.

Etant donné que le processus de sporulation est très coûteux et que, si jamais les conditions nutritionnelles redeviennent favorables, les spores sont désavantagées face à des cellules qui peuvent reprendre la croissance rapidement, on peut s'attendre à ce que les bactéries retardent la formation de spores jusqu'à ce que celle-ci devienne le seul recours possible. Le processus de sporulation est notamment irréversible chez *B. subtilis* environ 2 heures après son initiation (Parker *et al.* 1996). Ainsi, plusieurs voies alternatives seront exploitées par cette bactérie avant de déclencher la sporulation en vue d'obtenir des nutriments, tels que le développement de compétence génétique afin d'incorporer des acides nucléiques extérieures (Msadek 1999) ou la lyse des cellules voisines, même celles de la même population dans un phénomène de cannibalisme (Gonzalez-Pastor *et al.* 2003).

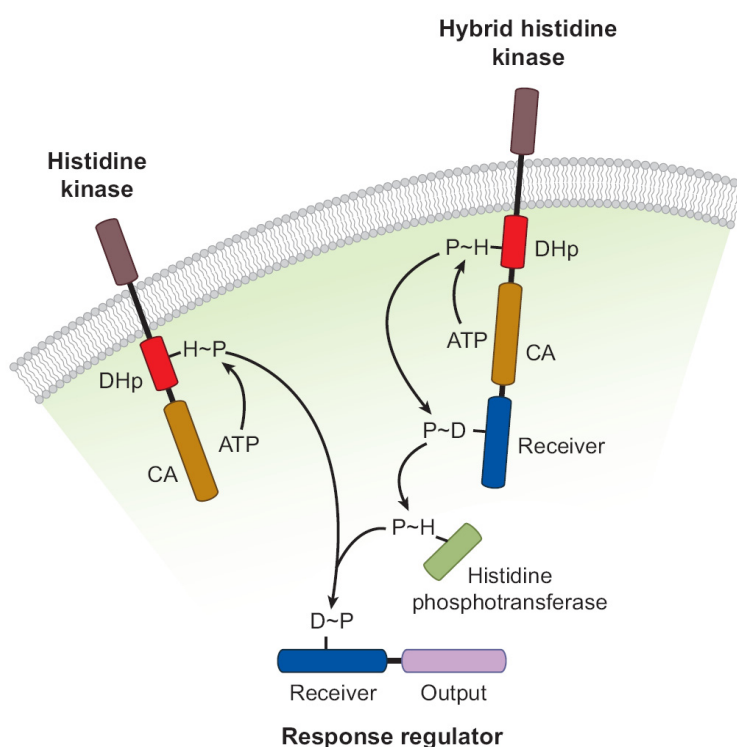


**Figure 12. Les étapes morphologiques de la sporulation.** La sporulation de *B. subtilis* démarre avec une septation asymétrique résultant dans une préspore et une cellule mère. La préspore est ensuite engloutie par la cellule mère. Les étapes suivantes incluent la formation du cortex et de la tunique, la maturation de l'endospore, la lyse de la cellule mère et la libération de la spore. La germination de la spore se produit quand les conditions extérieures redeviennent favorables, donnant lieu à une cellule végétative. Image tirée de Errington (2003).

De façon intéressante, un des paramètres régulant l'entrée en sporulation est la densité bactérienne (Grossman *et al.* 1988). Dans des conditions de basse densité bactérienne, qui impliquent un faible degré de compétition pour les nutriments, *B. subtilis* montre un taux de sporulation plus bas. Il semblerait que l'attente de nouvelles sources d'énergie puisse représenter dans ces conditions une meilleure option que la sporulation.

### Les systèmes de transduction à deux composants

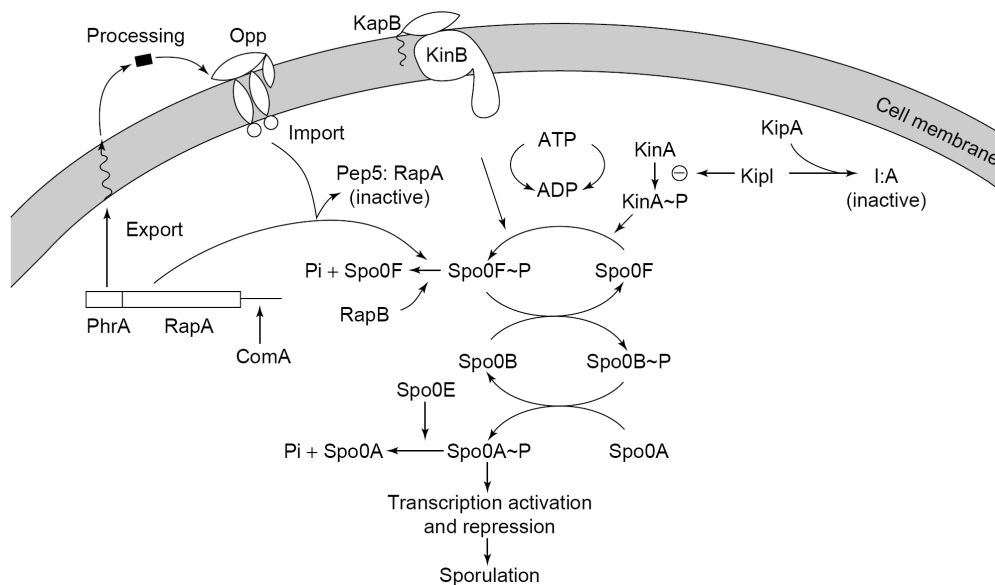
Comme le montrent ces exemples, l'entrée en sporulation est régulée de manière extrêmement fine. Quelques aspects de cette régulation commencent à être bien connus. Chez *B. subtilis*, l'intégrateur majeur des signaux extérieurs responsable du déclenchement de la sporulation est le régulateur transcriptionnel Spo0A. L'accumulation intracellulaire de la forme phosphorylée de cette protéine au-delà d'un certain seuil déclenche la cascade transcriptionnelle qui aboutit à la formation de l'endospore (Fujita *et al.* 2005). Les signaux extracellulaires sont donc intégrés dans un réseau complexe de transduction appelé « phosphorelay » qui régule la phosphorylation de Spo0A et constitue une version sophistiquée des systèmes de transduction à deux composants. Ces systèmes de signalisation impliquent des phosphotransferts His-Asp (cf. fig. 13) et sont très répandus chez les procaryotes : *E. coli* (Mizuno 1997) et *B. subtilis* (Fabret *et al.* 1999) en possèdent environ une trentaine. Chez les eucaryotes, ces systèmes sont anecdotiques, les voies de signalisation prédominantes font intervenir des phosphorylations de type phosphoester sur sérine, thréonine et tyrosine (Stock *et al.* 2000).



**Figure 13. Paradigme de la transduction du signal par les systèmes à 2 composants.** Dans la variante prototypique (gauche), une histidine kinase s'autophosphoryle sur un résidu histidine conservé avec transfert subséquent du groupement phosphate au régulateur de réponse correspondant. La variante « phosphorelay » (droite) implique un multiple transfert His-Asp-His-Asp. Une histidine kinase hybride s'autophosphoryle et transfère le phosphate intramoléculairement à un domaine accepteur (en bleu) similaire à celui du régulateur de réponse. Une histidine phosphotransférase (en vert) catalyse ensuite le transfert du groupement phosphate entre la kinase et le régulateur. CA : domaine catalytique et ATPase ; DHp : domaine histidine phosphotransférase. Image tirée de Laub *et al* (2007).

Les systèmes de transduction à deux composants font intervenir classiquement une histidine kinase senseur, généralement transmembranaire, et un régulateur de réponse. La kinase s'autophosphoryle sur un résidu histidine suite à un stimulus extérieur et le groupement phosphate est ensuite transféré à un résidu aspartate du régulateur (cf. fig. 13, exemple à gauche), activant ainsi une réponse cellulaire, souvent transcriptionnelle. Dans la variante « phosphorelay » (cf. fig. 13, exemple à droite), un transfert multiple His-Asp-His-Asp se produit, faisant intervenir une kinase hybride, une phosphotransférase et le régulateur de réponse. Au contraire de la plupart des cascades de signalisation eucaryote, la transduction à deux composants n'entraîne pas une amplification du signal, puisque le transfert du groupement phosphate est stoechiométrique.

Dans le cas du « phosphorelay » qui régule l'entrée en sporulation chez *B. subtilis*, la reconnaissance du signal est effectuée au moins par deux kinases senseurs (cf. fig. 14), une soluble (KinA) et une transmembranaire (KinB). A la différence des kinases hybrides, le premier domaine récepteur n'est pas porté par KinA ou KinB, mais par la protéine soluble Spo0F. L'histidine phosphotransférase Spo0B catalyse finalement le transfert du groupement phosphate vers la protéine Spo0A (Perego 1998). Plusieurs voies de régulation confluent dans ce système, impliquant des phosphatases qui sont activées en réponse à des stimuli divers (comme RapA, RapB ou Spo0E) ou des activateurs (KapB) et inhibiteurs (KipI) des kinases (cf. fig. 14).



**Figure 14. Représentation schématique du réseau de signalisation et modulation qui régule l'entrée en sporulation de *B. subtilis*.** Les kinases KinA et KinB transfèrent des groupements phosphate de l'ATP au système. L'activation de KinB nécessite la lipoprotéine KapB. KinA est régulée négativement par l'inhibiteur KipI, dont l'activité est contrebalancée par l'anti-inhibiteur KipA. L'accumulation de la forme phosphorylée du régulateur de réponse intermédiaire Spo0F (Spo0F~P) est limitée par les phosphatases RapA and RapB. L'expression de RapA est induite par le régulateur de réponse ComA qui intervient dans le développement de la compétence, et son activité est modulée par le peptide PhrA. La phosphatase Spo0E est le point final de contrôle, modulant le niveau de Spo0A~P par déphosphorylation directe. Spo0A~P déclenche le programme transcriptionnel qui conduit à la sporulation. Image tirée de Perego (1998).

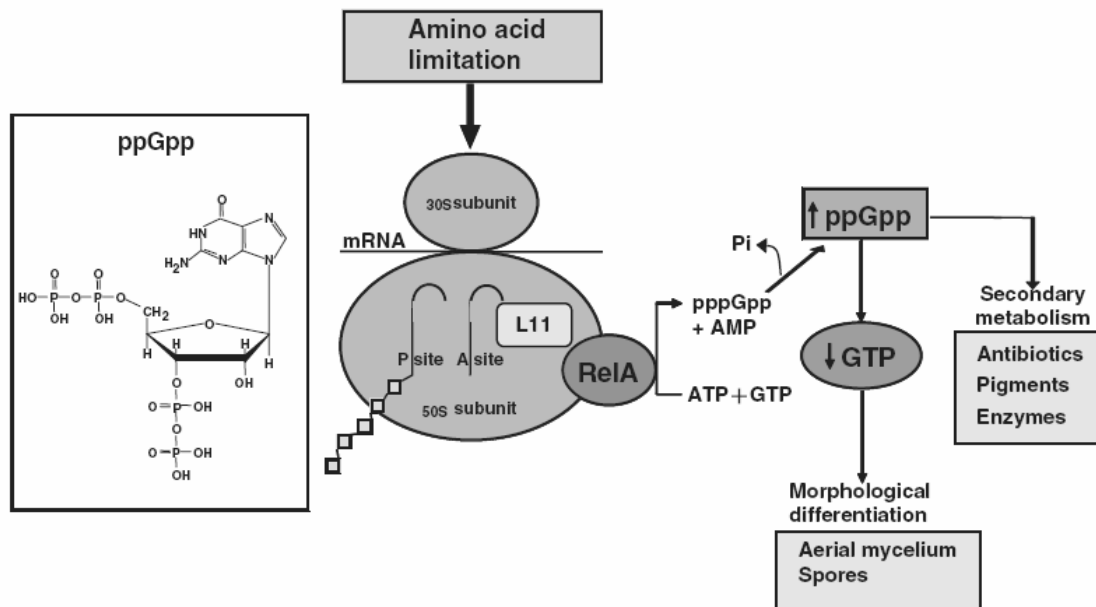
## La réponse stringente

Seulement quelques genres bactériens (dont *Bacillus*, *Clostridium* et *Streptomyces*) sont capables de sporuler. La stratégie bactérienne la plus générale face à des conditions environnementales adverses, e.g. la disponibilité limitée d'un nutriment essentiel, est la réponse appelée « stringente ». Dans ces conditions, les bactéries exercent un contrôle dit stringente de l'expression de nombreux gènes et enzymes ; la marque distinctive étant notamment la répression de la synthèse des ARN ribosomaux et de transfert (Sands *et al.* 1952). L'expression de certains gènes est induite, comme ceux impliqués dans la biosynthèse d'acides aminés. Il a été montré pour *E. coli*, *B. subtilis* et d'autres bactéries que des dérivés hyperphosphorylés des nucléotides de guanosine constituent un lien important entre la carence nutritionnelle et la réponse stringente (Cashel *et al.* 1969). Cette molécule, (p)ppGpp (guanosine 3'-diphosphate 5'-di/triphosphate), s'accumule dans le cytoplasme en réponse au stress nutritionnel suite à l'action de la protéine RelA, qui phosphoryle le GDP ou le GTP en position 3' en utilisant l'ATP comme donneur de phosphate (cf. fig. 15).

Comment s'effectue la transduction du stress ? La carence nutritionnelle se traduit, entre autre, par une faible concentration intracellulaire en acides aminés et, par conséquent, par une diminution de la proportion d'ARNt aminoacylés. L'enzyme RelA, qui interagit avec le ribosome, serait activée par la présence d'un ARNt non-aminoacylé dans le site A de la sous-unité 50S du ribosome (cf. fig. 15 ; Haseltine *et al.* 1973). L'augmentation conséquente de la concentration du (p)ppGpp induirait d'une part l'inhibition de la réplication de l'ADN et donc un arrêt de la croissance (Wang *et al.* 2007), et d'autre part une réponse transcriptionnelle spécifique, principalement via la liaison du (p)ppGpp à l'ARN polymérase (Artsimovitch *et al.* 2004). Une étude comparative de transcriptome et protéome entre une souche sauvage de *B. subtilis* et une souche  $\Delta relA$  a permis d'identifier 20 protéines et environ 40 unités transcriptionnelles contrôlées négativement par la réponse stringente, ainsi que 13 protéines et 50 unités transcriptionnelles soumises à un contrôle positif (Eymann *et al.* 2002).

Une autre conséquence de l'accumulation de (p)ppGpp chez *B. subtilis* est l'inhibition de la déhydrogénase d'inosine monophosphate (IMP), la première enzyme de la voie de synthèse du GTP. L'inhibition de cette enzyme par le (p)ppGpp entraîne une accumulation du substrat IMP, qui est également le précurseur de l'ATP. La réponse stringente est caractérisée ainsi par un changement réciproque des concentrations d'ATP et GTP (Lopez *et al.* 1981). Les changements physiologiques orchestrés lors de la réponse stringente pourraient donc résulter non seulement de l'action du (p)ppGpp, mais également de la modification des concentrations des nucléotides GTP et ATP.

**Figure 15. Représentation schématique de la réponse stringente bactérienne.** La présence d'un ARNt non aminoacylé dans le site A du ribosome active la kinase RelA, qui catalyse le transfert de groupement phosphate de l'ATP vers le GTP pour former du (p)ppGpp. Cette molécule de guanosine hyperphosphorylée régule la transcription de nombreux gènes modulant ainsi le métabolisme secondaire, et entraîne en même temps une diminution de la concentration de GTP (cf. texte). Cette diminution peut déclencher des phénomènes de différenciation morphologique, tels que la sporulation. Image extraite de Ochi (2007).



Ainsi, chez *Bacillus subtilis*, la modulation de la concentration de GTP lors de la réponse stringente régulerait la sporulation, la production d'antibiotiques et le développement de compétence (Braeken *et al.* 2006). La sporulation chez *Streptomyces* est également déclenchée par la diminution de la concentration de GTP, alors que la différenciation cellulaire chez *Myxococcus xanthus* aboutissant à la formation des spores semble répondre plutôt au (p)ppGpp (Harris *et al.* 1998). Ces observations suggèrent que la réponse stringente active non seulement des voies de métabolisme secondaire, mais aussi de phénomènes de différenciation morphologique (cf. fig. 15).

Par quel mécanisme les nucléotides ATP et GTP induisent-ils ces réponses cellulaires ? Un modèle séduisant propose une modulation de la transcription de gènes dont l'ARN messager débiterait par A ou G. La distribution des nucléotides dans cette position (appelée +1) s'est avérée non aléatoire : dans le cas des gènes dépendants du facteur  $\sigma^A$ <sup>4</sup> chez *B. subtilis*, 56% démarrent par A et 38% par G (Krasny *et al.* 2008). Ces auteurs ont montré que la mutation de quelques uns de ces promoteurs (intervertissant A et G dans les positions +1) inverse l'effet observé lors de la réponse stringente : les gènes normalement surexprimés deviennent réprimés, et inversement.

<sup>4</sup> Le facteur  $\sigma$  est la sous-unité de l'ARN polymérase qui dicte la reconnaissance des promoteurs. Le facteur  $\sigma^A$  est le facteur sigma primaire de *B. subtilis*, responsable majeur de l'activité de transcription des cellules en phase de croissance rapide. Il existe des preuves expérimentales d'une transcription dépendante de  $\sigma^A$  pour une quarantaine des gènes régulés lors de la réponse stringente (Krasny *et al.* 2008).

### Les transporteurs de drogues chez *Bacillus subtilis*

L'analyse du génome de *B. subtilis* a identifié une trentaine de transporteurs putatifs de drogues, révélant que cette bactérie non pathogène présente un des plus grands arsenaux de ce type de transporteurs retrouvés chez les bactéries dont le génome a été séquencé (Paulsen *et al.* 2001). Le pourcentage de transporteurs de *B. subtilis* qui transportent potentiellement des drogues s'élève notamment à 18% ; un tel pourcentage pourrait rendre cette bactérie efficace dans la compétition pour la croissance et la survie face à d'autres microorganismes producteurs d'antibiotiques présents dans le sol (Paulsen *et al.* 1998). Parmi ces transporteurs, environ 80% correspondent à des transporteurs de la famille MFS et moins de 10% à des transporteurs ABC (Paulsen *et al.* 2001). Ce dernier chiffre a été réévalué dans l'inventaire réalisé par le groupe de Denizot (Quentin *et al.* 1999), proposant 8 transporteurs ABC de drogues au lieu de 3.

Alors qu'un nombre important de ces transporteurs ABC ont été étudiés (discutés dans la section suivante), seulement 4 membres des protéines MFS MDR putatives ont été caractérisées (cf. tableau 5): Bmr et Blt, ainsi qu'un troisième appelé Bmr3 dont le gène n'est pas chromosomique mais porté dans un plasmide ; et plus récemment, le transporteur LmrB, capable de conférer une résistance à la lincomycine et à la puromycine. En dehors des familles MFS et ABC, il existe des preuves expérimentales d'une activité de transport de drogues pour 3 autres protéines (cf. tableau 5): les transporteurs SMR EbrA/B et YkkC/D, qui fonctionneraient comme hétérodimères ; et la protéine RND YerP, qui constitue le premier exemple de transporteur RND de multiples drogues dans une bactérie à Gram +.

Transporteur	Famille	Substrats*	Référence
Bmr	MFS	éthidium, chloramphénicol, puromycine, TPP, CTAB	Neyfakh <i>et al.</i> 1991
Blt	MFS	éthidium, rhodamine, acriflavine, TPP, doxorubicine, norfloxacin	Ahmed <i>et al.</i> 1995
Bmr3	MFS	puromycine, tosufloracin, norfloxacin	Ohki <i>et al.</i> 1997
LmrB	MFS	lincomycine, puromycine, doxorubicine, daunorubicine, rhodamine 6G, norfloxacin	Kumano <i>et al.</i> 2003; Murata <i>et al.</i> 2003
EbrA/EbrB	SMR	éthidium, acriflavine, pyronine Y, TPA, TPP, safranine O, cristal violet, CTAB	Masaoka <i>et al.</i> 2000; Zhang <i>et al.</i> 2007
YkkC/YkkD	SMR	éthidium, proflavine, pyronine Y, TPA, cristal violet, cétylpyridinium, chloramphénicol, streptomycine, tétracycline, phosphonomycine	Jack <i>et al.</i> 2000
YerP	RND	surfactine, acriflavine, éthidium	Tsuge <i>et al.</i> 2001

**Tableau 5. Transporteurs MDR de *B. subtilis* caractérisés** (sauf transporteurs ABC). \* cf. Annexes A-D pour la structure chimique de ces composés. TPP : tétraphénylphosphonium ; TPA : tétraphénylarsonium ; CTAB : bromure de cétyltriméthylammonium.

## Les transporteurs ABC de drogues chez *Bacillus subtilis*

Suite à la disponibilité des séquences génomiques, des inventaires de transporteurs ABC ont été établis pour *E. coli* (Linton *et al.* 1998), *B. subtilis* (Quentin *et al.* 1999) et *M. tuberculosis* (Braibant *et al.* 2000)<sup>5</sup>. Si l'on compare le répertoire de protéines ABC de ces organismes (cf. tableau 6), on constate que *M. tuberculosis* possède, malgré une taille comparable du génome, environ la moitié de transporteurs ABC par rapport à *B. subtilis* et *E. coli*. Les fusions NBD-NBD et TMD-NBD sont courantes chez les trois organismes, la topologie « inversée » NBD-TMD étant absente chez *B. subtilis*. Chez *M. tuberculosis* on trouve, en plus, des protéines ABC comportant des fusions « inhabituelles » TMD-NBD-TMD-NBD (que l'on pensait exclusif des eucaryotes), TMD-NBD-NBD ou TMD-TMD.

Dans cette classification, 3 sous-familles sont impliquées dans l'export de drogues et d'antibiotiques : les sous-familles 3, 6 et 7. Ces sous-familles correspondent *grosso modo* aux transporteurs de types II, III et I, respectivement, des actinomycètes producteurs d'antibiotiques présentés précédemment (cf. tableau 2), même si quelques protéines de type II des actinomycètes se rapprochent plutôt de la sous-famille 7. Les protéines NBD<sub>2</sub> (cf. tableau 3) sont groupées dans la sous-famille 3.

De façon intéressante, le rapport importateurs vs. exportateurs est similaire chez *B. subtilis* et *M. tuberculosis*, mais les exportateurs sont significativement moins représentés chez *E. coli* (rapport importateurs vs. exportateurs : 3.4 pour *E. coli*, 1.1 pour *B. subtilis* et 0.7 pour *M. tuberculosis*). Les exportateurs additionnels chez *M. tuberculosis* et *B. subtilis* appartiennent majoritairement aux sous-familles 6 et 7, qui comprennent des transporteurs de drogues et d'antibiotiques. L'expansion de ces sous-familles pourrait être liée à l'absence de membrane externe chez ces bactéries à Gram +<sup>6</sup> et donc à une exposition accrue aux xénobiotiques et antibiotiques présents dans leur niche écologique et/ou chez l'hôte (Quentin *et al.* 1999). Ceci étant, dans l'inventaire des protéines ABC de *E. coli*, 22 protéines n'ont été attribuées à aucune sous-famille (cf. tableau 6). Il est possible que d'autres transporteurs de drogues soient présents parmi ces protéines non classées. Plus concrètement, 2 protéines de topologie TMD-NBD font partie de celles-ci, alors que chez *B. subtilis* toutes les protéines TMD-NBD ont été répertoriées comme transporteurs de drogues (dans la sous-famille 6). En effet, quelques modifications à ce premier inventaire d'*E. coli* ont été proposées par d'autres auteurs (Saier *et al.* 1998b ; Dassa *et al.* 1999), dont notamment des transporteurs de drogues additionnels.

<sup>5</sup> Par ailleurs, le répertoire de transporteurs de ~320 bactéries a été établi par le groupe de Paulsen et peut être consulté sur la base de données *TransportDB* (Ren *et al.* (2004) ; <http://membranetransport.org>).

<sup>6</sup> L'absence de membrane externe chez *M. tuberculosis* et son appartenance aux bactéries Gram + sont quand même assez contestées, cf. discussion dans la section dédiée à cette bactérie.



	<i>E. coli</i> K-12	<i>B. subtilis</i> 168	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
<b>Statistiques</b>			
taille du génome (10 <sup>6</sup> paires de bases)	4.6	4.2	4.4
systèmes ABC totaux	69	78	37
ABC complets (au moins 1TMD+1NBD)	57	59	26
% du génome (régions codantes)	5	5	2.5
importateurs putatifs	44*	38	16
exportateurs putatifs	13*	40	21
% importateurs	77%	49%	43%
% exportateurs	23%	51%	57%

<b>Topologie</b> (protéines multidomaines)			
protéines multidomaines totales	25	20	15
TMD-NBD totaux	7	12	5
dont homodimères	3	4	1
dont hétérodimères	2	4	2
NBD-TMD	2	0	1
NBD-NBD +TMD dans l'opéron	10	3	3
-TMD dans l'opéron	6	5	2
TMD-TMD	0	0	2
TMD-NBD-NBD	0	0	1
TMD-NBD-TMD-NBD	0	0	1

<b>Classification</b>	Substrat putatif			
Sous-famille 1	sucres	8	4	0
Sous-famille 2	peptides	7	3	2
Sous-famille 3	macrolides	4	5	3
Sous-famille 4	acides aminés	6	5	3
Sous-famille 5	carbohydrates/ glycine/bétaïne	7	14	4
Sous-famille 6	drogues	3	8	5
dont homodimères		1	4	3
dont hétérodimères		2	4	1
1 seul polypeptide		0	0	1
Sous-famille 7	antibiotiques	3	15	6
Sous-famille 8	sidérophores-fer	4	9	2
Sous-famille 9	inconnu	3	8	0
Sous-famille 10	acides aminés	2	0	0
Sous-famille 11	phosphate/sulfate/ molybdate	0	3	4
Sous-famille 12	inconnu	0	2	2
Non classés	divers	22	2	4

**Tableau 6. Comparaison de la composition en protéines ABC de 3 génomes bactériens.** Tableau construit à partir des inventaires des protéines ABC établis chez *E. coli* par Linton *et al.* (1998), chez *B. subtilis* par Quentin *et al.* (1999) et chez *M. tuberculosis* par Braibant *et al.* (2000); ainsi qu'à l'aide des serveurs *Colibri*, *Subtilist* et *Tuberculist* de l'Institut Pasteur (Moszer *et al.* 1995; Moszer 1998; Moszer *et al.* 2002). Les sous-familles contenant des transporteurs de drogues sont signalées en couleur.

\* Pour l'identification d'importateurs et d'exportateurs, les auteurs n'ont comptabilisé que les ABC complets chez *E. coli*, alors que dans les cas de *M. tuberculosis* et *B. subtilis* tous les systèmes ABC ont été inclus. TMD : domaine transmembranaire ; NBD : domaine nucléotidique.

Comme indiqué dans le tableau 6, *Bacillus subtilis* possède 8 transporteurs ABC putatifs de multiples drogues (classés dans la sous-famille 6), dont 4 demi-transporteurs formant probablement des homodimères (YvcC, YwjA, YgaD et SunT) et 8 demi-transporteurs qui, de par leur présence « en tandem » dans le génome, constituent potentiellement des hétérodimères (CydC/CydD, YfiB/YfiC, Yhel/YheH et YknU/YknV ; Quentin *et al.* 1999).

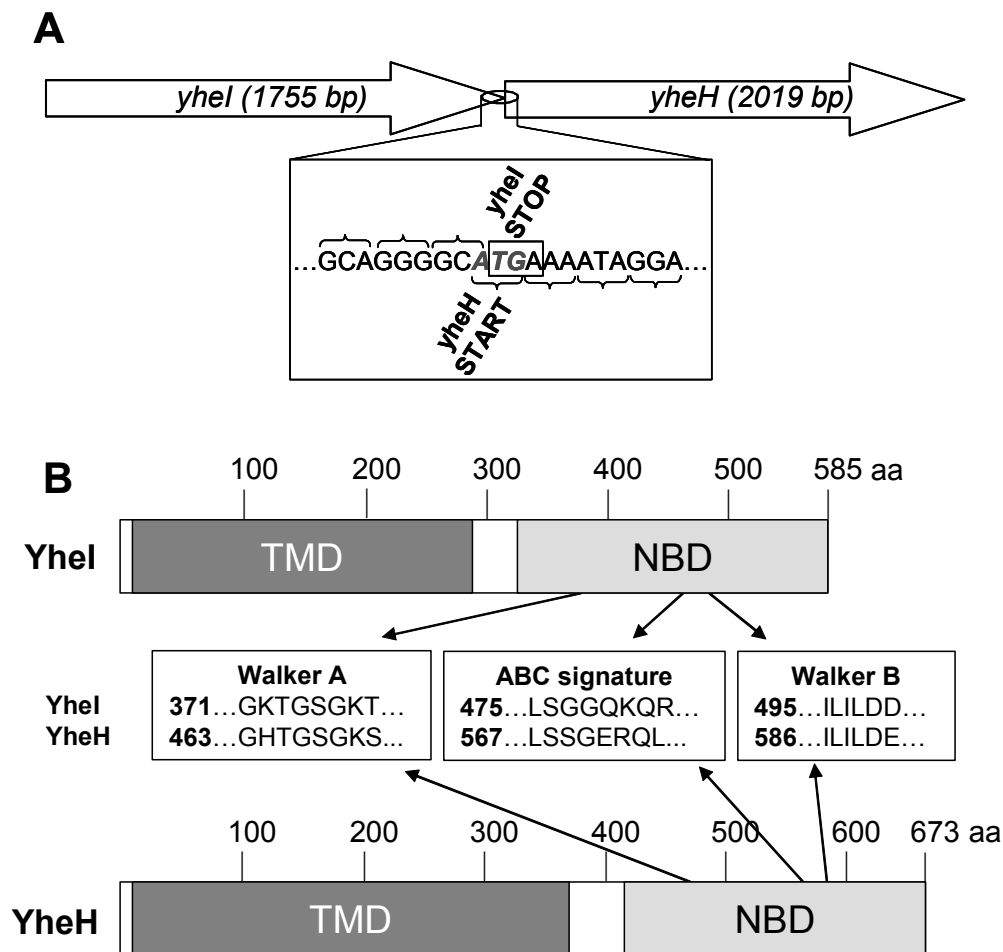
Parmi les homodimères, SunT a été identifié comme le transporteur responsable de l'export de l'antibiotique sublancine 168 produit par *Bacillus subtilis* 168 (Paik *et al.* 1998). YvcC a été amplement étudié par notre équipe. Son activité de transport de drogues a été confirmée et caractérisée en détail (cf. tableau 4), et le transporteur a été renommé en conséquence BmrA pour *B. subtilis* **multidrug resistance ATP** (Steinfels *et al.* 2004). De plus, l'homodimère a été démontré comme étant l'unité fonctionnelle en membrane (Dalmas *et al.* 2005a) et en détergent (Ravaud *et al.* 2006).

Parmi les hétérodimères putatifs, seul CydC/CydD a été étudié ; il est impliqué dans la biogenèse du cytochrome bd (Winstedt *et al.* 1998). Son homologue chez *E. coli* a été caractérisé en détail et la cystéine (Pittman *et al.* 2002) et le glutathion (Pittman *et al.* 2005) ont été identifiés comme substrats exportés. De façon intéressante, cette capacité à exporter du glutathion est partagée par d'autres transporteurs de multiples drogues, notamment le transporteur de multiples drogues MRP1 (ABCC1) chez l'homme (Cole *et al.* 2006). Dans tous les génomes analysés, les gènes *cydC* et *cydD* sont invariablement maintenus en opéron. Par contre, les gènes voisins ne sont pas toujours les mêmes, ce qui pourrait traduire un phénomène de « shuffling » (recombinaison génétique répétée et aléatoire) de l'unité *cydC/cydD* au cours de l'évolution (Cruz-Ramos *et al.* 2004). Chez *Streptomyces coelicolor*, ces deux gènes ont fusionné codant une seule protéine à topologie TMD-NBD-TMD-NBD, avec introduction d'une séquence « linker » (de liaison) d'environ 20 acides aminés entre le premier NBD et le seconde TMD.

Un autre des hétérodimères putatifs de *B. subtilis*, Yhel/YheH, fait l'objet de ce travail de thèse et sera abordé dans la section suivante.

LE TRANSPORTEUR YHEI/YHEH DE *B. SUBTILIS*

Les gènes *yheI* et *yheH* sont organisés en opéron (cf. fig. 16A ci-dessous) et codent des protéines de 585 et 673 acides aminés, respectivement. YheI et YheH sont constituées chacune d'un domaine transmembranaire N-terminal et d'un domaine nucléotidique C-terminal. Ces domaines nucléotidiques contiennent les motifs caractéristiques des protéines ABC Walker A, Walker B et signature ABC, détaillés dans la fig. 16B. L'alignement de leur séquence protéique avec l'algorithme ClustalW (Thompson *et al.* 1994) indique un taux d'identité entre YheI et YheH de 26% (plus 22% de résidus fortement similaires). Leur taux d'identité/similitude avec la glycoprotéine-P humaine est du même ordre de grandeur (24-25% d'identité plus 25% de similitude). On trouve des homologues beaucoup plus proches dans les bactéries, avec des taux d'identité proches de 40% chez des Gram + tels que *Listeria monocytogenes* ou *Streptococcus pneumoniae*, mais aussi chez la bactérie Gram - *E. coli*, qui seront décrits en détail plus tard (cf. tableau 7).



**Figure 16. Organisation de l'opéron *yheI/yheH* chez *B. subtilis* (A) et topologie prédite des protéines YheI et YheH (B).** Les codons *start* de *yheH* et *stop* de *yheI* sont indiqués, soulignant leur chevauchement. Les motifs caractéristiques des protéines ABC sont détaillés pour les deux protéines. bp : paires de bases ; TMD : domaine transmembranaire ; NBD : domaine nucléotidique.

Comme indiqué dans la figure 16A, les gènes *yhel* et *yheH* sont chevauchants, avec quatre paires de bases partagées et donc un changement du cadre de lecture ou « frameshift » de +2 (ou -1 en fonction de la définition utilisée). Le codon d'initiation de *yheH* se superpose à l'avant-dernier codon et au codon *stop* de *yhel*. De plus, une séquence putative de terminaison de transcription a été identifiée en 3' de *yheH* (Kunst *et al.* 1997; Noback *et al.* 1998). Cet arrangement suggère que les deux gènes sont transcrits dans un même ARN messager.

### *Yhel/YheH et le stress cellulaire*

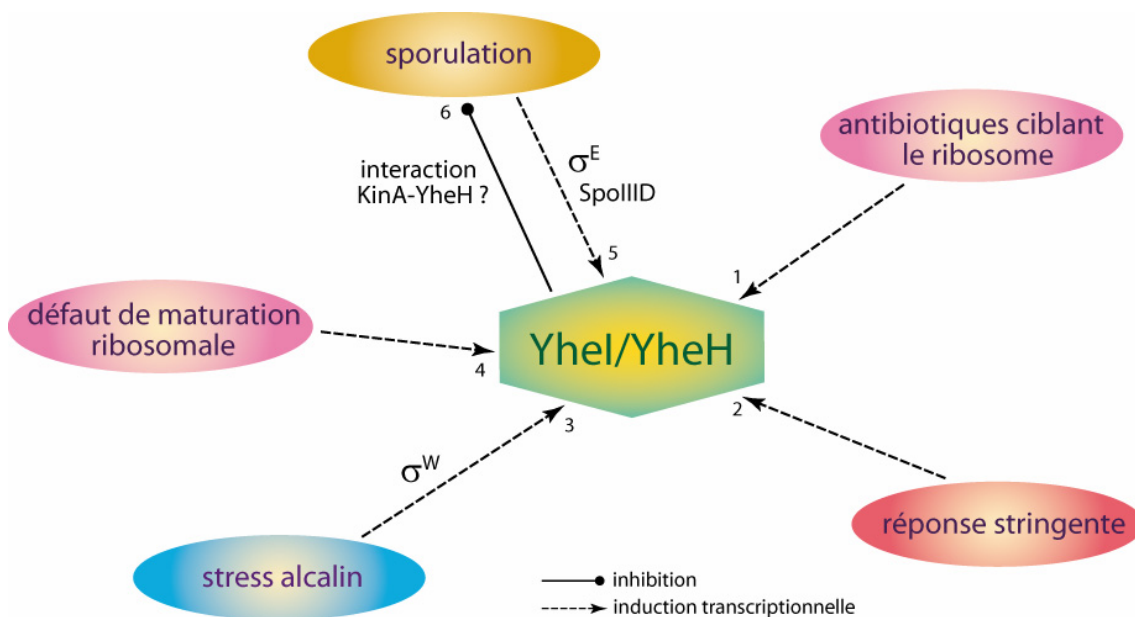
Plusieurs études adressant la réponse transcriptionnelle de *B. subtilis* face à l'exposition à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques ont trouvé une induction de *yhel/yheH* en présence d'une diversité importante de composés (au total plus d'une trentaine d'antibiotiques différents ; cf. tableau 11). Le groupe de Freiberg (Urban *et al.* 2007) a montré que la région 5' non traduite de *yhel* est probablement responsable de cette réponse transcriptionnelle, en construisant une souche rapportrice où le gène de la luciférase a été mis sous le contrôle de cette région (paires de bases -500/-15 par rapport au codon d'initiation de *yhel*). En utilisant la région 5' non traduite de *yheH* dans une approche équivalente, aucune induction de la luciférase n'a pu être observée en présence d'antibiotiques (Hutter *et al.* 2004a). Ceci est en accord avec l'hypothèse de *yhel/yheH* étant transcrits dans un ARN messager bicistronique sous le contrôle d'un même promoteur en 5' de *yhel*.

Le spectre d'antibiotiques capables de stimuler la transcription de *yhel/yheH* est très caractéristique : La plupart inhibent la synthèse protéique, et une grande majorité atteignent la sous-unité 50S du ribosome. Cette spécificité dans le profil de réponse transcriptionnelle a conduit à proposer le promoteur de *yhel* (et *yheH*) comme rapporteur utilisable pour identifier de nouveaux antibiotiques susceptibles d'affecter la synthèse protéique (Urban *et al.* 2007).

D'autres liens semblent exister entre l'expression de *yhel/yheH* et l'état du ribosome. D'une part, la stimulation de la transcription de *yhel/yheH* a été observée lors de la réponse stringente de *B. subtilis* (cf. fig. 17 ; Eymann *et al.* 2002). Comme évoqué précédemment, cette réponse est déclenchée suite à l'arrêt ribosomique causé par la carence en acides aminés (cf. fig. 15). L'autre lien entre *yhel/yheH* et le ribosome provient de l'étude de transcriptome réalisé par le groupe de R. Britton sur une souche de *B. subtilis* portant une délétion conditionnelle du gène *ylqF*. La protéine YlqF est une GTPase essentielle chez *B. subtilis* qui participe à la biogenèse du ribosome. Les cellules déplétées en YlqF ne sont pas capables d'assembler correctement la sous-unité 50S et accumulent des particules ribosomiques immatures; de ce fait, la protéine a été renommée RbgA pour Ribosome Biogenesis GTPase A (Uicker *et al.* 2006). Ces auteurs ont comparé le transcriptome de *B. subtilis* avant et après déplétion de RbgA et, de façon intéressante, la surexpression de *yhel/yheH* est observée lors du défaut ribosomique induit par la délétion de RbgA (cf. fig. 17).

La stimulation de la transcription de *yheI/yheH* par les antibiotiques pourrait alors faire partie d'une réponse cellulaire générale au stress ribosomique, et ne pas résulter de l'intervention de facteurs de transcription dédiés (qui devraient être capables de répondre à une telle diversité d'antibiotiques). Ces conjectures nous mènent au cœur de la question sur le rôle physiologique du transporteur YheI/YheH: efflux d'antibiotiques ou autre fonction inscrite dans la réponse globale au stress ? Nous reviendrons à cette question par la suite.

Par ailleurs, l'expression de *yheH* semble répondre à un autre type de stress : le stress alcalin. Une augmentation soudaine du pH de 6.3 à 8.9 dans le milieu extracellulaire de *B. subtilis* induit l'expression de ~80 gènes, dont *yheH* (Wiegert *et al.* 2001). Cette induction est dépendante du facteur de transcription  $\sigma^W$  pour une partie importante de ces gènes, y compris *yheH*. Le rapport entre  $\sigma^W$  et *yheH* est renforcé par une étude de mutagenèse insertionnelle, où il a été observé que l'insertion d'un minitransposon dans le gène de *yheH* entraîne une activité accrue de  $\sigma^W$  (Turner *et al.* 2000). En revanche, aucun détail n'est spécifié dans ces études en ce qui concerne *yheI*, ce qui pourrait relever du seuil choisi pour estimer l'effet inducteur (ou des conditions expérimentales en général). Or, il est aussi envisageable que la transcription de *yheH* puisse se faire indépendamment de celle de *yheI* à partir d'un promoteur exclusif. La question qui se pose dans ce cas de figure est si YheH peut fonctionner en tant qu'homodimère seul outre sa participation à un hétérodimère avec YheI.



**Figure 17. Schéma récapitulatif des processus physiologiques de *Bacillus subtilis* faisant intervenir YheI/YheH**, construit à partir des résultats expérimentaux suivants : (1) Hutter *et al.* 2004b; Lin *et al.* 2005; Freiberg *et al.* 2006; Urban *et al.* 2007; (2) Eymann *et al.* 2002; (3) Wiegert *et al.* 2001; (4) Uicker *et al.* 2006; (5) Eichenberger *et al.* 2004; (6) Fukushima *et al.* 2006. Voir le texte pour la description des différentes études.

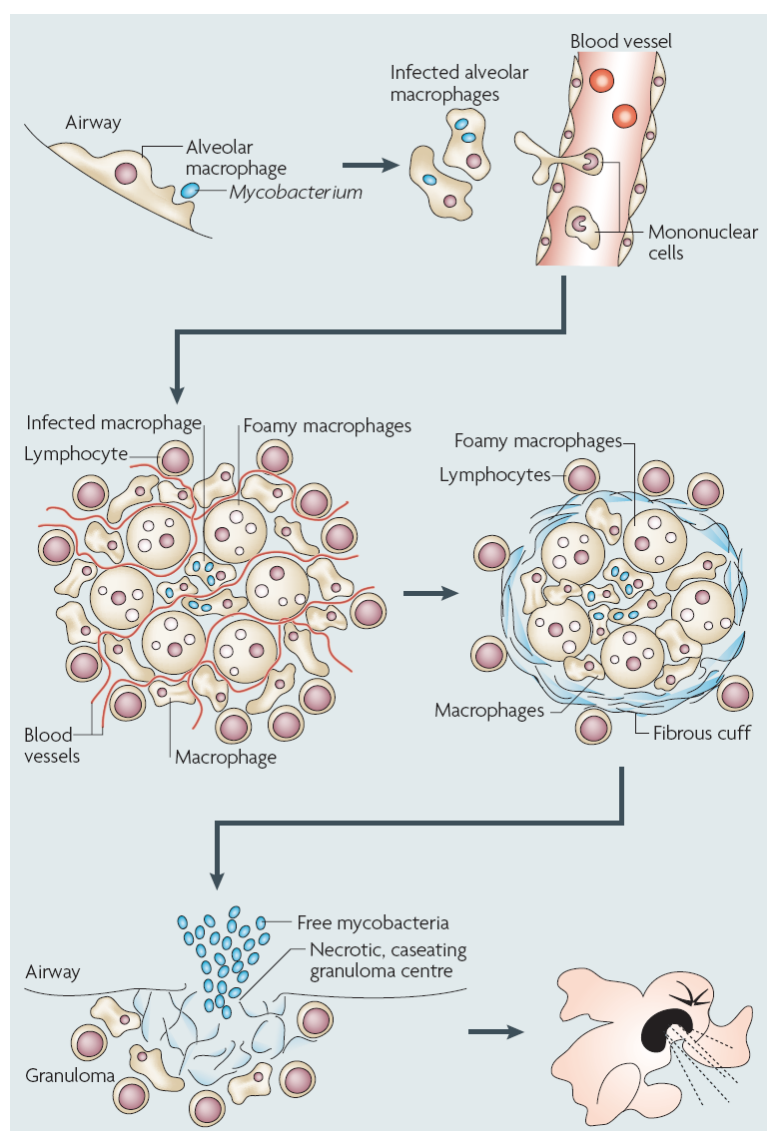
## *YheI/YheH et la sporulation*

Finalement, un rapport des protéines YheI/YheH avec la sporulation de *B. subtilis* a été suggéré par deux études différentes (cf. fig. 17):

- 1) Lors de la sporulation, la transcription des gènes *yheI/yheH* est contrôlée par le facteur  $\sigma^E$  et activée par le facteur de transcription SpoIIID (Eichenberger *et al.* 2004). Le facteur SpoIIID lui-même est activé par  $\sigma^E$ , qui est le premier facteur actif dans la cellule mère après la septation asymétrique (cf. fig. 12). Ces auteurs ont observé cependant que la délétion de *yheI* n'affecte pas l'efficacité de sporulation de la bactérie.
- 2) La surexpression de *yheI/yheH* entraîne une diminution de l'efficacité de sporulation dans une souche délétée de *kinB*, ainsi qu'une réduction drastique de la transcription de gènes dépendants du régulateur de réponse Spo0A~P (Fukushima *et al.* 2006), ce qui suggère que l'entrée en sporulation est bloquée par une phosphorylation insuffisante de Spo0A (cf. fig. 14). De plus, en utilisant la technique de double hybride, ces auteurs ont détecté une interaction entre YheH et KinA, la kinase responsable avec KinB du transfert initial de phosphate dans la cascade de signalisation qui déclenche la sporulation (cf. fig. 14). Ainsi, le groupe de Yoshikawa propose que la surexpression de YheI/YheH entraînerait une inactivation de KinA par interaction directe entre le transporteur et la kinase qui empêcherait Spo0A d'atteindre un niveau d'activation suffisant pour déclencher la sporulation (la phosphorylation de Spo0A serait limitée). Comme dans l'autre étude, aucun effet n'a été observé lors de la délétion de *yheH* ou *yheI/yheH* sur le taux de sporulation de la bactérie.

## LA BACTERIE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

*Mycobacterium tuberculosis*, l'agent pathogène responsable de la maladie de la tuberculose, fut décrit en 1882 par Robert Koch comme le « bacille tuberculeux ». Cette découverte lui vaudra le Prix Nobel en 1905, et *Mycobacterium tuberculosis* sera désormais connu sous le nom de bacille de Koch. La maladie doit son nom à sa manifestation histologique : Suite à sa transmission par voie aérienne, la bactérie réussit à pénétrer dans un macrophage alvéolaire et induit une invasion du tissu pulmonaire par celui-ci. L'hôte répond alors par la formation des tubercules ou granulomes dans un effort pour limiter l'infection (cf. fig. 18). Dans l'état de granulome, la bactérie peut persister des années dans l'hôte sous forme dormante sans manifestation clinique. En effet, la manifestation la plus courante de la tuberculose consiste en la réactivation chez l'adulte d'une infection chronique préexistante, réactivation déclenchée généralement par un état perturbé du système immunitaire provoqué par le virus du SIDA, l'âge, le stress ou une carence nutritionnelle.



**Figure 18. Les étapes de l'infection par *M. tuberculosis*.** L'infection par les mycobactéries suit une séquence assez bien définie : Les bacilli sont inhalés sous forme de gouttelettes présentes dans l'atmosphère. La dose infectieuse est estimée à une seule bactérie. Dans le poumon, les mycobactéries sont phagocytées par des macrophages alvéolaires et induisent une réponse proinflammatoire localisée. Le granulome ou tubercule, caractéristique de la tuberculose, consiste en un noyau de macrophages infectés entourés de macrophages « écumeux » (riches en lipides) et d'autres phagocytes mononucléaires. Une couche de lymphocytes associés à une masse fibreuse de collagène et d'autres composants de la matrice extracellulaire définissent la périphérie de la structure. A ce stade, il n'y a aucun signe évident de maladie et l'hôte n'est pas contagieux. Quand l'état immunitaire de l'hôte change, le granulome explose en une masse de débris cellulaires qui libère des milliers de bacilli viables et infectieux dans les voies aériennes. Cela déclenche la toux chez l'hôte, facilitant la dispersion par aérosol des bacilli infectieux. Image tirée de Russell (2007).

Environ un tiers de la population mondiale serait infectée par *M. tuberculosis*. Le risque de développer la maladie par un individu infecté est estimé à 5-10%, même si cette estimation montre une forte variation géographique, notamment en fonction du niveau socio-économique et de l'incidence du SIDA (Russell 2007). La synergie mortelle avec le virus de l'immunodéficience humaine, ainsi que l'apparition répandue de souches résistantes aux médicaments (cf. annexe B), a conduit en 1993 à la déclaration de la tuberculose comme urgence globale par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Le nombre de décès par tuberculose en 2006 a été estimé à 1,7 millions (dont 0,2 millions VIH-positifs), et à plus de 9 millions le nombre de nouveaux cas<sup>7</sup>.

La biologie de *M. tuberculosis* est extensivement étudiée depuis plus d'un siècle, grâce à l'isolement de la souche H37 en 1905. Cette souche s'avérait notamment très virulente chez les cobayes, ce qui servit dans la première partie du siècle au diagnostic de la « tuberculose humaine ». En 1934, H37 fut dissocié en deux souches, une avirulente (H37Ra) et une virulente (H37Rv) (Bifani *et al.* 2000), et le génome de cette dernière a été séquencé en 1998 (Cole *et al.* ). Avec 4,4 mégapaires de bases, le génome de *M. tuberculosis* constitue, en taille, le deuxième génome bactérien séquencé (après *E. coli*) et possède un contenu en G+C très élevé (65,6%).

Les propriétés caractéristiques de *M. tuberculosis* sont une croissance lente, un état latent, une paroi cellulaire complexe, la pathogénicité intracellulaire et l'homogénéité génétique (Cole *et al.* 1998). Le temps de génération de la bactérie, que ce soit en milieu synthétique ou chez l'animal infecté, est de ~24 heures, ce qui -combiné à sa capacité de latence- contribue à la nature chronique de la maladie et impose un traitement médical très prolongé (cf. annexe B). Celui-ci n'est pas forcément très efficace parce que la plupart des médicaments disponibles visent les bactéries en cours de réplication. Les fondements moléculaires de la latence et de la réactivation restent majoritairement obscurs, rendant difficile le développement d'antibiotiques ciblant ces étapes.

Le complexe *Mycobacterium tuberculosis*, qui comprend les mycobactéries responsables de la tuberculose chez l'homme et d'autres animaux (principalement *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii* et *M. caprae*), représente un des exemples les plus extrêmes d'homogénéité génétique, avec 0.01%-0.03% de variation nucléotidique synonyme (Gutierrez *et al.* 2005). Ce niveau de polymorphisme silencieux est beaucoup plus faible que ce qui est observé chez d'autres bactéries pathogènes et ne serait pourtant pas imputable à un taux de mutations spontanées particulièrement réduit (Sreevatsan *et al.* 1997). Comme explication à ce faible niveau de polymorphisme, ces auteurs proposent que *M. tuberculosis* serait vraisemblablement un organisme jeune d'un point de vue évolutif, n'ayant divergé que récemment. De façon intéressante, l'utilisation d'antibiotiques serait devenue une des forces majeures de pression évolutive : 95% des mutations ponctuelles détectées par ces auteurs serait en lien avec la résistance aux antibiotiques. A la différence d'autres bactéries pathogènes, les déterminants de résistance chez *M. tuberculosis* seraient

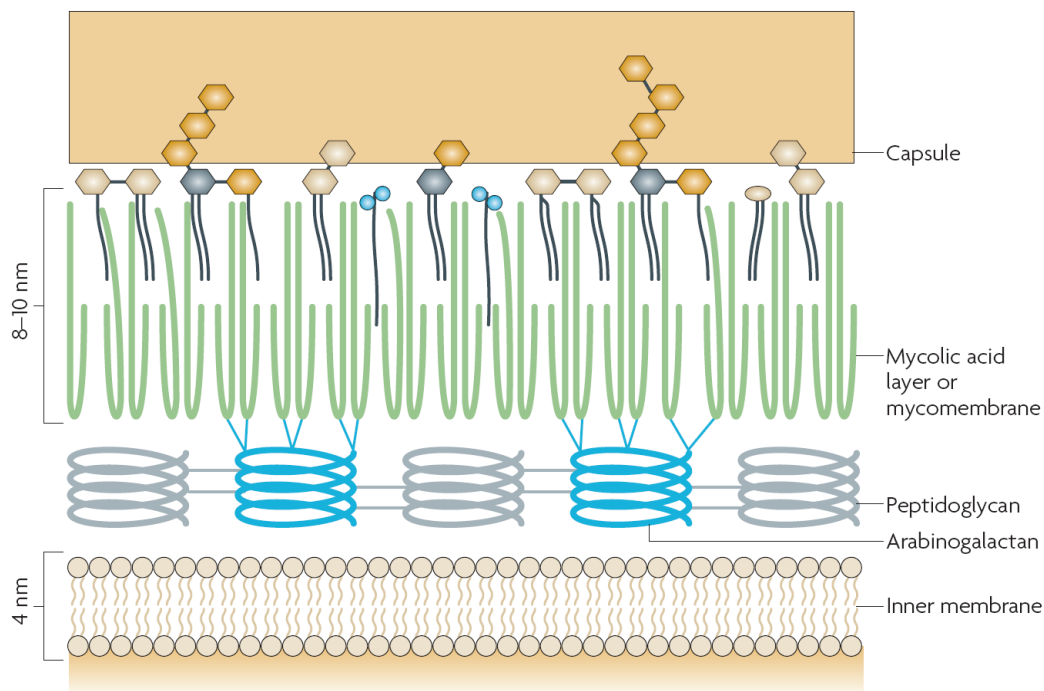
<sup>7</sup> Rapport mondial 2008 de l'OMS sur la lutte contre la tuberculose : [www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/key\\_points/fr/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/key_points/fr/index.html)



exclusivement présents dans son chromosome. Le codage chromosomique, ainsi que la difficulté pour éradiquer les infections latentes, impliquent une forte probabilité de persistance pour ces déterminants de résistance (Sreevatsan *et al.* 1997).

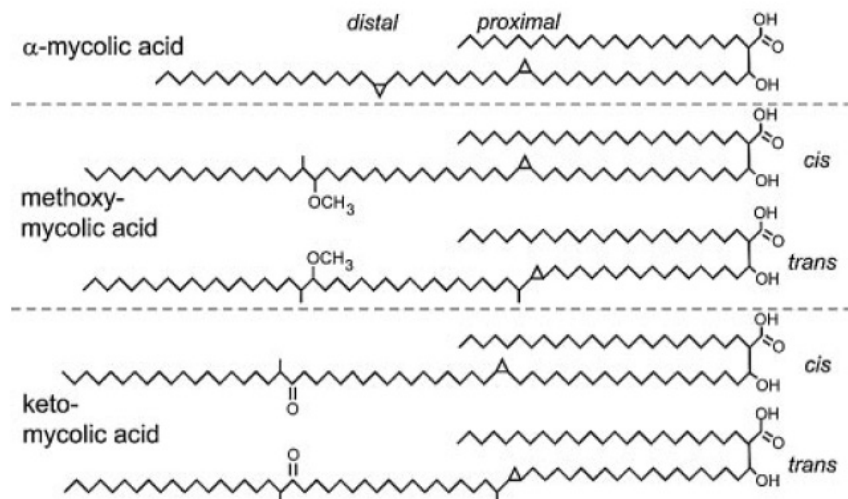
### *La paroi cellulaire de M. tuberculosis*

Les études basées sur l'ARN ribosomique ont conduit à la classification des mycobactéries parmi les bactéries à Gram +, même si les mycobactéries ne retiennent pas le colorant Gram. En effet, leur paroi cellulaire est très caractéristique, incluant plusieurs couches additionnelles au-delà du peptidoglycan, composées de lipides, glycolipides et polysaccharides inhabituels (cf. fig. 19). Les composants majeurs de cette paroi sont des acides gras spécifiques appelés acides mycoliques (cf. fig. 20), pouvant représenter jusqu'à 60% du poids sec de ces organismes. Les différents types d'acides mycoliques servent notamment à distinguer différentes espèces de mycobactéries. Il a été montré par des méthodes de microscopie électronique que cette couche lipidique des mycobactéries constitue une véritable membrane externe (Hoffmann *et al.* 2008), qui enfermerait un espace périplasmique et serait cohérent avec la présence de protéines de type porine constatée auparavant (Niederweis 2003).



**Figure 19. Représentation schématique de la paroi cellulaire des mycobactéries.** Trois composants liés covalentement constituent le noyau principal de la paroi extracellulaire de *M. tuberculosis*: le peptidoglycan (gris), l'arabinogalactane (bleu) et les acides mycoliques (vert). La liaison covalente des acides mycoliques avec l'arabinogalactane résulte en une couche hydrophobe de fluidité extrêmement réduite, qui est également connue sous le nom de mycomembrane. Sa face extérieure contient plusieurs lipides spécifiques, tels que les glycolipides phénoliques, les sulfolipides, les dimycocérosates ou le dimycolyltrehalose, qui s'intercalent avec les acides mycoliques. La plupart de ces lipides sont spécifiques des mycobactéries. La couche extérieure, appelée généralement capsule, contient principalement des polysaccharides. Image tirée de Abdallah *et al.* (2007).

**Figure 20. Structures chimiques des acides mycoliques de *M. tuberculosis*.** Les acides mycoliques sont des acides gras  $\beta$ -hydroxylés avec une longue chaîne  $\alpha$ -alkyl. Il en existe cinq formes chez *M. tuberculosis*, chacune pouvant présenter des longueurs de chaîne carbonnée variables ( $C_{54}$ - $C_{63}$  dans l'acide gras et  $C_{22}$ - $C_{24}$  dans la chaîne latérale  $\alpha$ ). Les anneaux de cyclopropane, qui peuvent adopter des configurations *cis* ou *trans* selon le type d'acide mycolique, contribuent à l'intégrité structurale de la paroi cellulaire, ainsi qu'à la protection de la bactérie face au stress oxydatif. Image tirée de Takayama *et al.* (2005).



Cette observation demande donc une révision de la taxonomie des eubactéries au-delà du paradigme Gram + et Gram -. Des analyses génomiques plus récentes basées sur la séquence génomique complète de *M. tuberculosis* semble indiquer que cette bactérie serait plus proche des Gram - (Fu *et al.* 2002). Au-delà de l'intérêt taxonomique, la compréhension de l'architecture de la paroi cellulaire chez les mycobactéries est cruciale parce que, en plus d'être associée à la virulence, cette structure de paroi leur confère un degré important de résistance au stress oxydatif à l'intérieur des phagosomes ainsi que d'imperméabilité, entre autre, face aux antibiotiques. Il est intéressant de noter qu'un tiers des antibiotiques de première et deuxième ligne utilisés dans le traitement de la tuberculose ciblent la synthèse de composants de la paroi (Sacchetti *et al.* 2008, cf. annexe B).

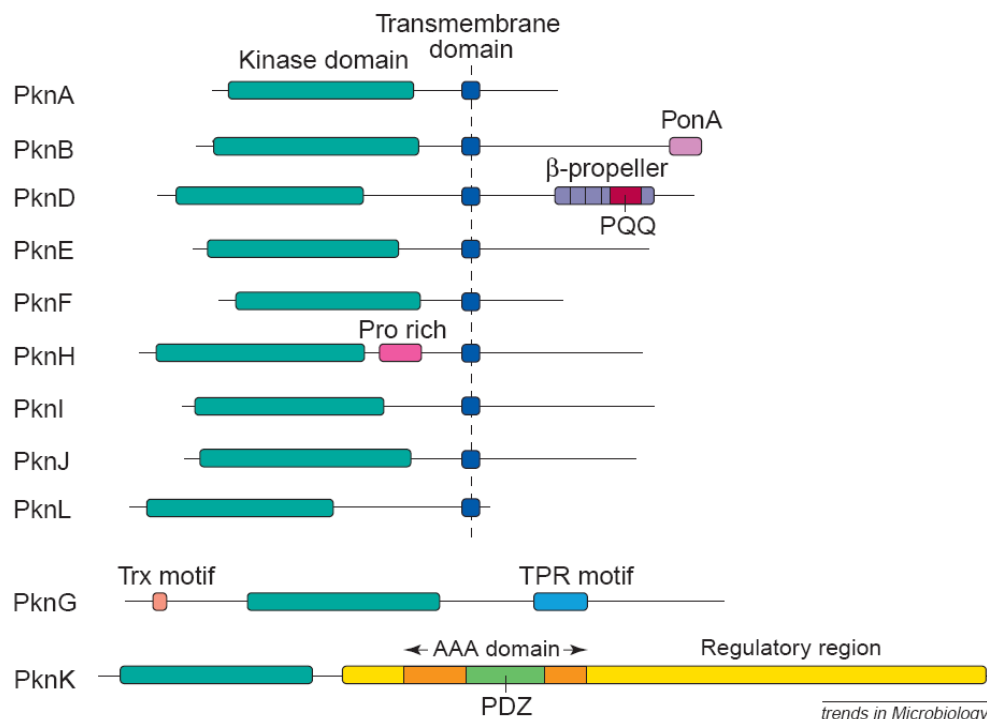
### *Les sérine/thréonine protéine kinases chez M. tuberculosis*

La complexité du cycle de développement de cette bactérie, devant répondre à des situations environnementales et métaboliques variables, nécessite vraisemblablement des mécanismes très développés de régulation et de signalisation. L'analyse du génome de *M. tuberculosis* a révélé la présence de seulement 11 systèmes de transduction à deux composants (cf. fig. 13), face à la trentaine retrouvée chez *E. coli* ou chez *B. subtilis* (Cole *et al.* 1998). Un système différent de signalisation, que l'on croyait exclusif des eucaryotes auparavant mais qui semble très représenté chez *M. tuberculosis*, concerne la phosphorylation de protéines en sérine et thréonine. 11 sérine/thréonine protéine kinases (STPKs) de type eucaryote ont été identifiées dans le génome de cette bactérie (Av-Gay *et al.* 2000) et appelées

PknA jusqu'à PknL (cf. fig. 21). En revanche, chez *B. subtilis*, seulement deux kinases de ce type ont été inventoriées (Shi *et al.* 1998), ce qui semble en faveur d'un rôle plus important de la signalisation via les systèmes à deux composants chez cet organisme. De même, *E. coli* ne posséderait que 3 STPKs de type eucaryote (Shi *et al.* 1998). Pour comparaison, la bactérie *Myxococcus xanthus*, caractérisée - tout comme *B. subtilis* - par un cycle cellulaire complexe et la différenciation en colonies pluricellulaires, possède un arsenal de 13 STPKs (Inouye *et al.* 2000) et une centaine de systèmes de transduction à 2 composants (Shi *et al.* 2008b). Les corrélations entre taille du génome ou complexité biologique et quantité de systèmes de transduction ne semblent pas évidentes.

La plupart des STPKs de *M. tuberculosis* (9 sur 11, cf. fig. 21 ci-dessous) possèdent un domaine kinase N-terminal suivi d'un segment transmembranaire, de tel sorte que l'extrémité C-terminale est extracellulaire, agissant potentiellement en tant que récepteur de signaux provenant de l'extérieur. Les différentes kinases possèdent ensuite divers modules impliqués dans la reconnaissance de protéines ou d'autres effecteurs, ou même dans des activités catalytiques additionnelles.

**Figure 21. Représentation schématique de la topologie et la composition modulaire des sérine/thréonine protéine kinases de *M. tuberculosis*.** PonA, domaine présentant une homologie avec la protéine de liaison à la pénicilline Rv0050, rebaptisé PASTA<sup>8</sup> ; PQQ, pyrroloquinoline quinone ; TPR, tétratricopeptide; Trx, thioredoxine; AAA, ATPase associée avec divers activités cellulaires ; PDZ, domaine impliqué dans la localisation submembranaire de molécules de signalisation. Tiré de Av-Gay *et al.* (2000).



<sup>8</sup> Ce type de domaine a été rebaptisé PASTA pour **P**enicillin-binding protein (PBP) **A**nd **S**erine/**T**hreonine kinase **A**ssociated domain (Yeats *et al.* 2002). Il est présent dans les PBPs de haut poids moléculaire et dans des STPKs de plusieurs pathogènes, surtout des bactéries à Gram + des genres *Bacillus* et *Clostridia*. Sa fonction serait la reconnaissance de peptidoglycan libre (non réticulé). Le domaine extracellulaire de PknB possède en fait quatre domaines PASTA (et pas seulement un comme proposé initialement par Av-Gay *et al.* (2000) et représenté dans la figure 21) ; PknB activerait la machinerie de biosynthèse de la paroi cellulaire en réponse à une forte concentration de peptidoglycan libre.

**Tableau 7. Récapitulatif des données expérimentales disponibles concernant les STPKs de *M. tuberculosis*.** Établi à partir de Greenstein *et al.* (2005), <sup>1</sup>Thakur *et al.* (2008b), <sup>2</sup>Park *et al.* (2008), <sup>3</sup>Perez *et al.* (2006), <sup>4</sup>Greenstein *et al.* (2007), <sup>5</sup>Zheng *et al.* (2007). - Aucun phénotype détecté. #Étude de « knock-down » en utilisant l'ARN antisens. \*Phosphorylation mise en évidence, sauf pour le transporteur GlnH. Les substrats phosphorylés contenant un ou plusieurs domaines FHA sont soulignés. \*\* La localisation de gènes voisins codant des domaines FHA a été vérifiée sur le serveur *TubercuList* de l'Institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>). Cf. fig. 23 concernant le réseau d'interactions observées entre différentes STPKs et domaines FHA.

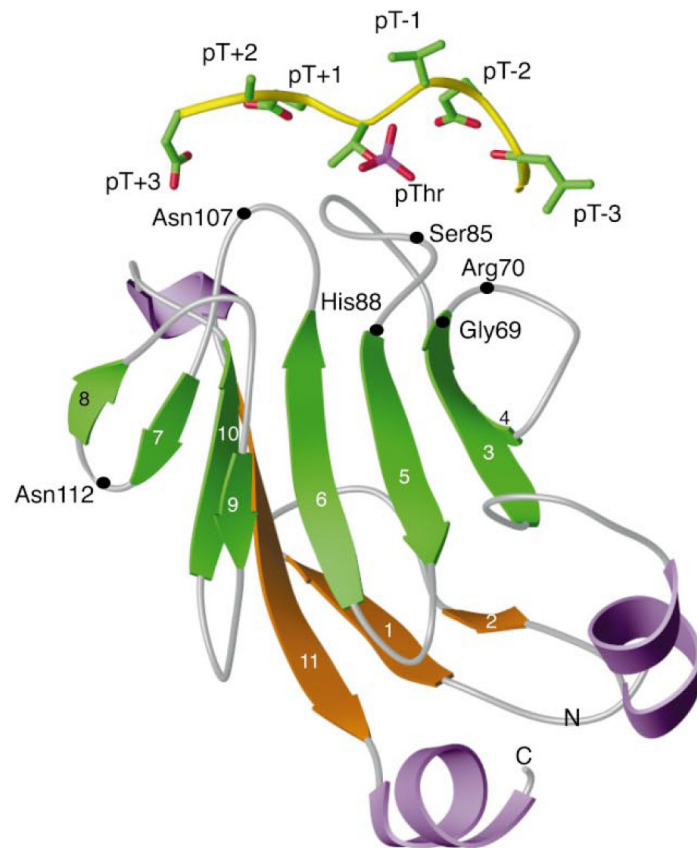
	Phénotype du mutant de délétion	Substrat putatif*	Gène voisin contenant un ou des domaines FHA**	Fonction putativement régulée
<b>PknA</b>	essentiel à la croissance	MurD <sup>1</sup> (biosynthèse peptidoglycan) Wag31 (homologue de <i>B. subtilis</i> DivIVA) Rv1422 (fonction inconnue)	<i>rv0020 (fhaA)</i> <i>rv0019 (fhaB)</i>	division et morphologie cellulaires
<b>PknB</b>	essentiel à la croissance	SigH <sup>2</sup> et RshA <sup>2</sup> (facteur sigma et anti-sigma correspondant) <u>GarA</u> (fonction inconnue) Wag31 (homologue de <i>B. subtilis</i> DivIVA) Rv1422 (fonction inconnue)	<i>rv0020 (fhaA)</i> <i>rv0019 (fhaB)</i>	division et morphologie cellulaires
<b>PknD</b>	-	transporteur RND MmpL7 <sup>3</sup> anti-anti-facteur sigma Rv0516c <sup>4</sup>		transport de facteurs de virulence?
<b>PknE</b>	-	?	<i>rv1747</i>	?
<b>PknF</b>	croissance accélérée morphologie cellulaire affectée#	transporteur ABC <u>Rv1747</u>	<i>rv1747</i>	?
<b>PknG</b>	essentiel à la croissance	transporteur de glutamine GlnH		niveaux de Glu/Gln
<b>PknH</b>	phénotype hypervirulent	régulateur transcriptionnel <u>EmbR</u> régulateur transcriptionnel Rv0681 <sup>5</sup> protéine de liaison à la pénicilline DacB1 <sup>5</sup>	<i>rv1267 (embR)</i>	résistance à l'éthambutol

## Les domaines FHA

Comme détaillé dans le tableau 7, plusieurs des substrats identifiés pour les STPKs de *M. tuberculosis* portent des domaines FHA. Ces domaines furent trouvés en premier dans des facteurs de transcription de type *forkhead* et baptisés ainsi FHA pour *forkhead associated* (Hofmann *et al.* 1995). Il s'agit d'un domaine de reconnaissance de phosphopeptides présent chez les procaryotes et les eucaryotes qui comprend 80-100 acides aminés et qui présente une forte spécificité pour la phosphothréonine (cf. fig. 22 pour la structure tridimensionnelle d'un domaine FHA). Plus de 200 protéines différentes contenant des domaines FHA ont été identifiées depuis, pouvant être impliquées dans divers processus tels que la signalisation intracellulaire, la transcription, le transport de protéines, la réparation d'ADN ou encore la dégradation protéique (Durocher *et al.* 2002).

Quel est le rôle des domaines FHA dans les substrats des STPKs de *M. tuberculosis* ? Il a été montré qu'au moins PknA, B, D, E, F, G, H, et I sont capables de s'autophosphoryler *in vitro* (Greenstein *et al.* 2005). A l'image des STPKs eucaryotes, l'autophosphorylation est censée stimuler leur activité kinase, ce qui a été en effet vérifié pour PknB (Boitel *et al.* 2003). De plus, l'autophosphorylation pourrait avoir une deuxième fonction, notamment la création de sites de liaison pour des protéines contenant des domaines FHA.

**Figure 22. Structure tridimensionnelle du domaine FHA-1 de Rad53 en complexe avec un phosphopeptide.** La structure de ce domaine FHA a été obtenue par cristallographie aux rayons X (Durocher *et al.* 2000) et par RMN (Liao *et al.* 1999). La position des résidus conservés dans les domaines FHA est indiquée dans la structure, mettant en évidence leur rôle dans la liaison du phosphopeptide. pT, phosphothréonine. Image tirée de Durocher *et al.* (2002).

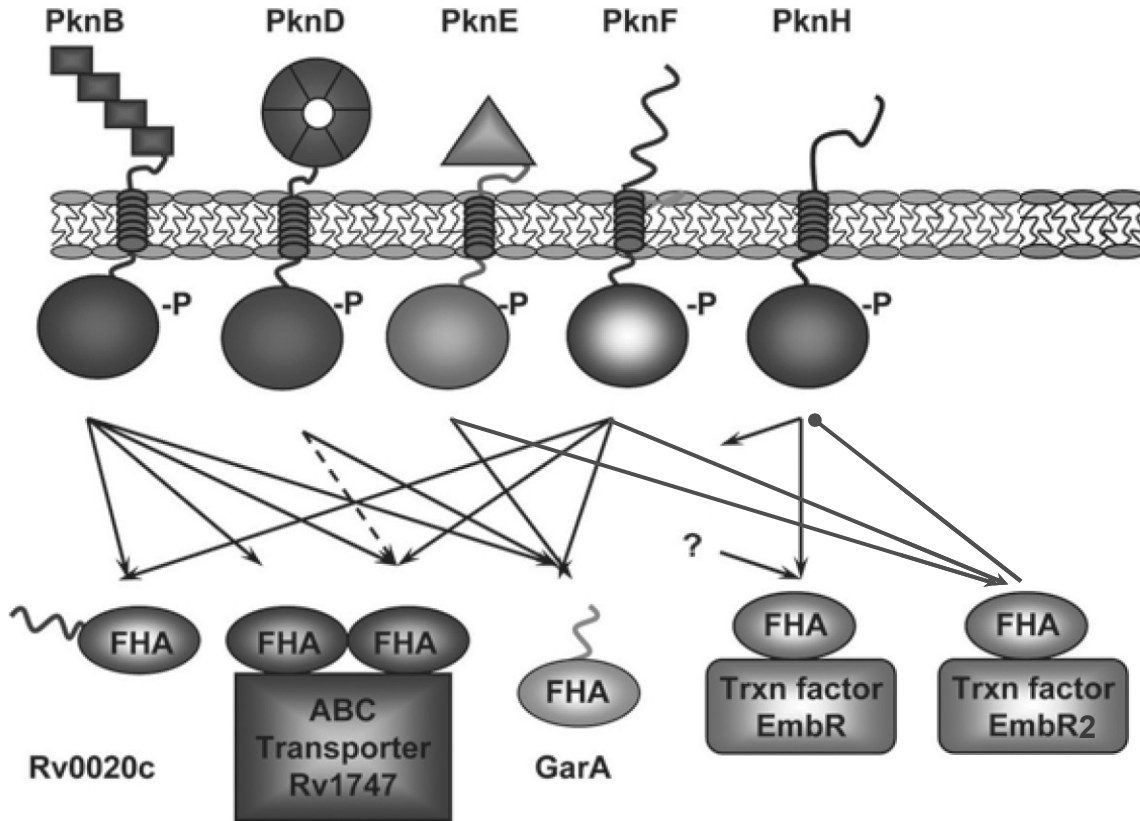


Chez *M. tuberculosis*, un total de 7 domaines FHA sont présents dans 6 protéines différentes : le transporteur ABC Rv1747 (contenant 2 domaines FHA), le régulateur transcriptionnel EmbR et son paralogue EmbR2, les protéines de fonction inconnue FhaA, FhaB et GarA. Sauf FhaB, qui n'a pas été étudiée, la phosphorylation de toutes ces protéines par une ou plusieurs STPKs a été observée *in vitro* (cf. fig. 23). Même si jusqu'à présent la seule phosphorylation mise en évidence *in vivo* est celle de GarA (Villarino *et al.* 2005), la proximité dans le génome de quelques paires géniques STPK/FHA (cf. tableau 7) semble indiquer la pertinence *in vivo* des phosphorylations observées *in vitro*.

Il a été montré que l'interaction GarA-PknB se produit grâce à la reconnaissance par le domaine FHA de GarA de phosphothréonines présentes dans la boucle d'activation<sup>9</sup> de la kinase, et que cette interaction est nécessaire à la phosphorylation de GarA par PknB (Villarino *et al.* 2005). La réactivité croisée observée entre les différentes STPKs et protéines contenant des domaines FHA (cf. fig. 23) s'expliquerait alors par le fait que, comme le montre l'exemple GarA-PknB, l'interaction FHA-kinase implique les résidus phosphorylés de la boucle d'activation de la kinase, et par l'observation que le profil d'autophosphorylation des différentes STPKs est presque identique en ce qui concerne cette boucle (Duran *et al.* 2005).

<sup>9</sup> La boucle d'activation est un segment des sérine/thréonine et des tyrosine kinases qui se trouve près de l'entrée du site actif. Chez nombreuses de ces kinases, cette boucle doit être phosphorylée avant que la kinase ne puisse phosphoryler des substrats. La phosphorylation de la boucle d'activation est effectuée en *cis* par la même kinase (par autophosphorylation) ou en *trans* par une autre (Newton 2003).

**Figure 23. Réseau d'interactions entre protéines contenant des domaines FHA et STPKs de *M. tuberculosis***, établi à partir d'expériences de phosphorylation *in vitro* avec les domaines kinases des STPKs isolés (Molle *et al.* 2003; Molle *et al.* 2004; Grundner *et al.* 2005; Villarino *et al.* 2005; Molle *et al.* 2008). La phosphorylation de GarA a été également observée *in vivo*. Image modifiée à partir de Greenstein *et al.* (2005). Les motifs extracellulaires des STPKs sont décrits dans la figure 20. La phosphorylation d'EmbR n'a été étudiée qu'en présence de PknH. EmbR2 (paralogue d'EmbR) se lie à PknH mais n'est pas phosphorylée par cette kinase (voir le texte ci-dessous).



De façon intéressante, les domaines FHA peuvent servir non seulement à l'ancrage des substrats des STPKs, mais aussi à celui d'inhibiteurs. La protéine EmbR2, paralogue du facteur de transcription EmbR chez *M. tuberculosis* CDC1551 mais absente dans la souche H37Rv, se lie à la kinase PknH sans être phosphorylée. Au contraire, cette association empêche la phosphorylation d'EmbR, le véritable substrat de PknH. EmbR2 pourrait donc agir *in vivo* comme inhibiteur compétitif de PknH (Molle *et al.* 2008).

### *Les transporteurs de drogues chez M. tuberculosis*

Depuis l'utilisation d'antibiotiques dans le traitement de la tuberculose, des souches résistantes ont été identifiées à tous les médicaments de première ligne et à plusieurs de deuxième ligne (cf. annexe B). Cette importante capacité de résistance multiple a été attribuée d'une part à la faible perméabilité de la paroi de *M. tuberculosis*, d'autre part et majoritairement à l'accumulation de mutations entraînant l'inactivation enzymatique des antibiotiques et/ou la modification des cibles des antibiotiques (Wade *et al.* 2004). Plus récemment, des souches résistantes à des antibiotiques ont été identifiées ne présentant aucune mutation dans les gènes impliqués classiquement dans des phénomènes de résistance. Ceci a questionné le paradigme établi et la surexpression de pompes à efflux commence à être considérée comme un mécanisme possible de développement de résistance, seul ou en combinaison avec des mutations sur d'autres gènes (De Rossi *et al.* 2006).

Plusieurs transporteurs de *M. tuberculosis*, surtout des familles MFS et ABC, ont été étudiés dans le but de vérifier leur capacité à exporter des drogues. L'approche typiquement employée est la surexpression du transporteur de façon hétérologue chez *M. smegmatis* et la détermination de la sensibilité aux antibiotiques et xénobiotiques (cf. tableau 10). Par contre, la pertinence de ces transporteurs dans les souches cliniques a été rarement adressée. La surexpression de quelques transporteurs identifiée dans des souches résistantes en réponse à la pression des antibiotiques (cf. tableau 8) constitue l'indice le plus solide de leur implication *in vivo* dans la résistance intrinsèque ou acquise (De Rossi *et al.* 2006).

Concernant le transporteur LfrA de *M. smegmatis*, la première pompe à efflux de drogues identifiée dans une mycobactérie (Takiff *et al.* 1996), nombreux détails de la régulation transcriptionnelle sont maintenant disponibles : LfrR, un régulateur transcriptionnel de la famille TetR codé par un gène adjacent à *lfrA*, exerce un contrôle négatif sur l'expression du transporteur (Li *et al.* 2004). La liaison de drogues à LfrR libère le gène *lfrA* de la répression et induit sa transcription (Buroni *et al.* 2006), à l'image de ce qui a été observé pour d'autres régulateurs de transporteurs de drogues (e.g. QacR) discutés précédemment.

Au-delà de LfrA, peu d'informations sont encore disponibles sur les transporteurs de drogues mycobactériens. Malgré la disponibilité de la séquence génomique depuis 1998, aucune étude n'a abordé la caractérisation moléculaire de ces transporteurs à part le travail réalisé sur le transporteur ABC DrrA/DrrB (Choudhuri *et al.* 2002). Ces auteurs ont dû optimiser la surexpression chez *E. coli* avant de pouvoir mener une étude biochimique du transporteur. Le manque de systèmes de surexpression efficace est vraisemblablement le facteur majeur limitant actuellement la caractérisation approfondie de ces pompes à efflux.

## Les transporteurs ABC de drogues chez *M. tuberculosis*

Dans la classification des transporteurs ABC de *M. tuberculosis* établie par Braibant *et al.* (2000), une quinzaine de transporteurs ont été classées dans les sous-familles 3, 6 et 7 (cf. tableau 6), dont les substrats putatifs sont des macrolides, des drogues et des antibiotiques, respectivement. Pour un tiers de ces protéines, des preuves expérimentales semblent confirmer leur implication dans le transport de drogues (cf. tableau 8). Deux transporteurs de la sous-famille 7 (DrrA/DrrB et Rv2688/7/8) semblent capables de conférer une résistance à plusieurs xénobiotiques quand ils sont surexprimés chez *M. smegmatis*, l'accumulation relative de quelques uns de ces substrats ayant été observée en absence de ces protéines (Choudhuri *et al.* 2002; Pasca *et al.* 2004). D'autre part, des résultats difficiles à interpréter ont été obtenus avec l'importateur de phosphate Pst : L'inactivation de cet importateur entraîne une sensibilité augmentée à plusieurs xénobiotiques ; de plus, il est surexprimé dans une souche résistante à la ciprofloxacine (Banerjee *et al.* 2000). Le rapport entre son activité documentée d'import de phosphate et son rôle dans la résistance aux drogues a besoin d'éclaircissement.

Rv0194, classé dans la sous-famille 6 des transporteurs ABC, a été identifié dans une étude de mutagenèse insertionnelle, où sa transcription augmentée entraînait une résistance accrue à plusieurs antibiotiques (Danilchanka *et al.* 2008). Les auteurs ont confirmé son effet protecteur en surexprimant la protéine chez *M. smegmatis* à partir d'un plasmide. De façon intéressante, le transporteur Rv0194 présente les deux domaines transmembranaires et les deux domaines nucléotidiques fusionnés dans un seul polypeptide (TMD-NBD-TMD-NBD), comme chez la glycoprotéine-P humaine. La comparaison des génomes de différentes mycobactéries<sup>10</sup> révèle que cette architecture fusionnée est observée chez les orthologues d'autres espèces appartenant au complexe *M. tuberculosis* décrit précédemment (on dispose de la séquence génomique de *M. tuberculosis* CDC1551 et *M. bovis*). Il semblerait que cette topologie très peu fréquente chez les procaryotes (absente e.g. chez *B. subtilis* ou *E. coli*, cf. tableau 6) serait le résultat de la fusion de deux gènes de topologie TMD-NBD qu'on retrouve non fusionnés (séparés par un triplet de bases) chez *M. smegmatis* (Msmeg5659 et Msmeg5660) ou *Mycobacterium sp. MCS* (Mmcs4446 et Mmcs4445).

Des indications d'une possible fonction d'efflux de drogues pour les transporteurs ABC Rv1819c et Rv1747 ont été obtenues par des études transcriptionnelles. La surexpression de Rv1819c, un transporteur classé dans la sous-famille 6, a été observée dans une souche clinique MDR suite à son exposition à l'isoniazide<sup>11</sup> (Jiang *et al.* 2008). Finalement, l'étude du transcriptome de *M. tuberculosis* suite à l'exposition à différents antibiotiques (Waddell *et al.* 2004), a révélé la surexpression de Rv1747 en présence de trois composés (cf. tableau 10). Ce transporteur, qui fait l'objet d'une partie de ce travail de thèse, sera abordé dans la section suivante.

<sup>10</sup> Comparaison réalisée sur le serveur *Comprehensive Microbial Ressource* (<http://cmr.jcvi.org/>)

<sup>11</sup> L'isoniazide est un antibiotique de première ligne du traitement de la tuberculose (cf. annexe B)



Gène(s) de <i>M. tuberculosis</i>	Famille	Substrats prédits <sup>a</sup>	Substrats identifiés <sup>c</sup>	Hôte utilisé pour l'étude <sup>d</sup>	Phénotype observé résistance induction de conférée l'expression efflux	Références
<b>Rv0194</b>	ABC	drogues/multiples drogues	AMP, CHL, STR, TTC, VAN	BCG/MSMEG	+	Danilchanka <i>et al.</i> 2008
<b>Rv0820 (PstB)*</b>	ABC	phosphate/anion	ACR, EB, FQ	MSMEG	+	Banerjee <i>et al.</i> 2000
<b>Rv1747</b>	ABC	lipooligosaccharide/?	ISO, THL, 967	MTB	+	Waddell <i>et al.</i> 2004
<b>Rv1819c</b>	ABC	homologue d'ALD <sup>e</sup> / multiples drogues	INH	MTB	+	Jiang <i>et al.</i> 2008
<b>Rv2686c/7c/8c</b>	ABC	antibiotiques	FQ	MSMEG	+	Pasca <i>et al.</i> 2004
<b>Rv2936 (DrrA) Rv2937 (DrrB)</b>	ABC	drogues/ antibiotiques	CHL, DOX, DNR, EB, ERY, ETH, NFL, STR, TTC	ECO/MSMEG	+	Choudhuri <i>et al.</i> 2002
<b>Msmeg6225 (LfrA)*<sup>1</sup></b>	MFS	multiples drogues	ACR, EB, FQ	MSMEG	+	Takiff <i>et al.</i> 1996
			ACR, EB	MSMEG	+	Sander <i>et al.</i> 2000; Li <i>et al.</i> 2004
<b>Msmeg5187 (Tet(V))*<sup>1</sup></b>	MFS	multiples drogues	TTC	MSMEG	+	De Rossi <i>et al.</i> 1998
<b>Rv1258c (tap)</b>	MFS	macrolides	AGL, TTC	MSMEG	+	Ainsa <i>et al.</i> 1998; De Rossi <i>et al.</i> 2002
			OFL, RIF	MTB	+	Siddiqi <i>et al.</i> 2004
			INH, RIF	MTB	+	Jiang <i>et al.</i> 2008
<b>Rv1410c (P55)</b>	MFS	drogues	AGL, TTC	MSMEG	+	Silva <i>et al.</i> 2001
			INH, RIF	MTB	+	Jiang <i>et al.</i> 2008
<b>Rv1634</b>	MFS	drogues	FQ	MSMEG	+	De Rossi <i>et al.</i> 2002
<b>Rv1877*</b>	MFS	drogues	ACR	MSMEG	+	Li <i>et al.</i> 2004
<b>Rv2333c (Stp)</b>	MFS	drogues	SPM, TTC	BCG	+	Ramon-Garcia <i>et al.</i> 2007
<b>Rv2846c (efpA)*</b>	MFS	drogues	ACR, CHL <sup>b</sup> , RIF <sup>b</sup>	MSMEG	+	Li <i>et al.</i> 2004
			INH, ISO, THL	MTB	+	Waddell <i>et al.</i> 2004
<b>Rv2942 (mmpL7)</b>	RND	?	INH	MSMEG	+	Pasca <i>et al.</i> 2005
<b>Rv3065 (emrE)*</b>	SMR	multiples drogues	ACR	MSMEG	+	Li <i>et al.</i> 2004

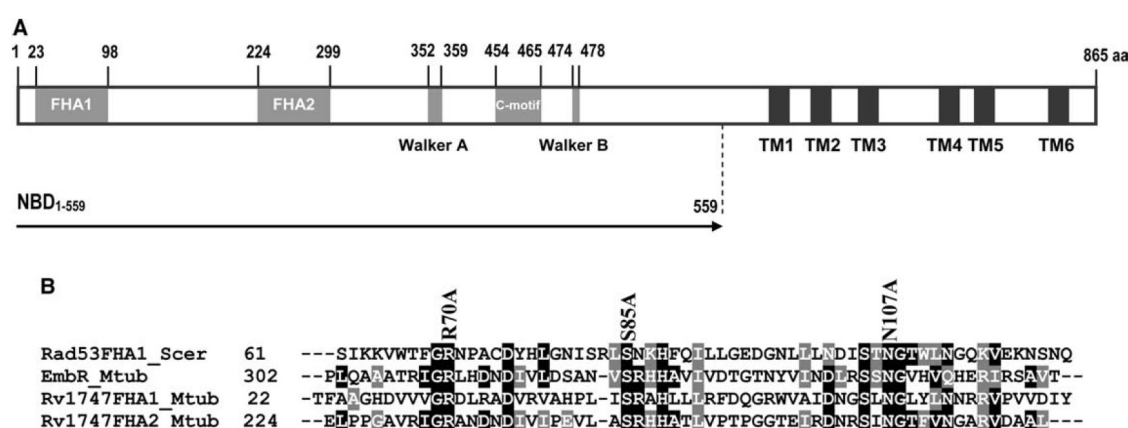
**Tableau 8. Transporteurs de drogues putatifs de *Mycobacterium tuberculosis* et *M. smegmatis* ayant été étudiés.**

\* Etude portant sur l'homologue de *M. smegmatis*, <sup>1</sup> pas d'orthologue chez *M. tuberculosis*. <sup>a</sup> Prédiction de *TransportDB* (Ren *et al.* 2004) ainsi que de Braibant *et al.* (2000) pour les transporteurs ABC. Tous les transporteurs sont prédits comme exportateurs, sauf PstB, qui interviendrait dans l'import de phosphate (cf. texte). <sup>b</sup> Résistance accrue observée pour le mutant de délétion. <sup>c</sup> cf. Annexes A-D pour la structure chimique de ces composés. ACR: acriflavine, AGL: aminoglycosides, AMP: ampicilline, CHL: chloramphénicol, DOX: doxorubicine, DNR: daunorubicine, EB: bromure d'éthidium, ERY : érythromycine, ETH : éthambutol, FQ: fluoroquinolones, RIF: rifampicine, INH: isoniazide, ISO: isoxyl, OFL: ofloxacin, SPM: spectinomycine, STR: streptomycine, TTC: tétracycline, VAN: vancomycine, THL: tétrahydroliptastatine, 967: composé SRI#967 de *Southern Research Institute*. <sup>d</sup> BCG : *Mycobacterium bovis* bacille Calmette–Guérin, MSMEG : *M. smegmatis*, MTB : *M. tuberculosis*, ECO : *Escherichia coli*. <sup>e</sup> ALD : adrénoleucodystrophie.

## LE TRANSPORTEUR Rv1747 DE *M. TUBERCULOSIS*

La protéine Rv1747 comprend 865 acides aminés et représente un demi-transporteur ABC. Un domaine nucléotidique et un domaine transmembranaire sont fusionnés donnant une topologie de type ABCG humain (NBD-TMD, cf. fig. 24 ci-dessous), l'unité fonctionnelle étant vraisemblablement l'homodimère (Braibant *et al.* 2000). De plus, comme évoqué précédemment, Rv1747 possède deux domaines FHA N-terminaux (cf. fig. 24). Le transporteur entier aurait donc 4 domaines FHA capables d'interagir avec des peptides ou protéines contenant des phosphothréonines.

Dans l'inventaire des transporteurs ABC mycobactériens, Rv1747 a été classé dans la sous-famille 7b, c'est-à-dire proche des exportateurs d'antibiotiques (sous-famille 7a) mais sans substrat identifié (Braibant *et al.* 2000). Si l'on fait une comparaison de la séquence de Rv1747 avec celle des protéines ABC de *B. subtilis*<sup>12</sup>, les transporteurs apparentés chez *Bacillus* ségrèguent dans 4 sous-familles différentes, dont les sous-familles 6 et 7. Il semblerait ainsi que ce transporteur ait des caractéristiques propres et ne soit clairement apparenté à aucun groupe.



**Figure 24. Domaines structuraux du transporteur ABC Rv1747.** (A) Représentation schématique des domaines, indiquant la position des deux domaines FHA, des motifs conservés Walker A, Walker B et du motif C (ou signature ABC), ainsi que les six hélices transmembranaires (TM) prédites. (B) Alignement de séquence des domaines FHA de Rad53 de *Saccharomyces cerevisiae* (seulement son premier domaine FHA), EmbR et Rv1747 de *M. tuberculosis*. Les résidus identiques sont surlignés en noir, les résidus similaires en gris. Sont indiqués les résidus arginine, sérine et asparagine impliqués chez Rad53/FHA1 dans la liaison du phosphopeptide d'après la structure tridimensionnelle (cf. fig. 22). Image tirée de Molle *et al.* (2004).

<sup>12</sup> Comparaison de séquence effectuée avec l'algorithme BLAST sur le serveur *Subtilist* de l'Institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/>) selon la méthode de Saurin *et al.* (1999), i.e. en utilisant la partie la plus conservée du domaine nucléotidique (depuis 30 résidus avant le motif A de Walker jusqu'au motif B de Walker).

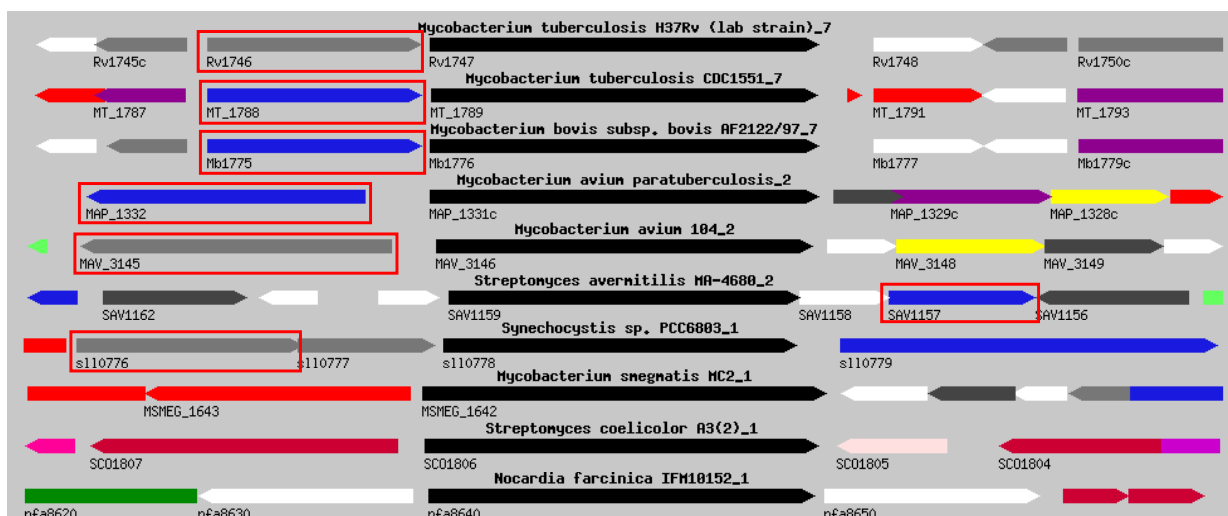
En dehors des mycobactéries, on trouve des homologues de Rv1747 chez les actinobactéries (e.g. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*), mais également chez les cyanobactéries tels que *Synechocystis* et *Thermosynechococcus* (cf. tableau 9). Le gène a dû être dupliqué plusieurs fois, puisqu'on trouve quatre paralogues chez *M. avium* et *M. avium paratuberculosis*, trois paralogues chez *Rhodococcus* et *Thermosynechococcus*, et deux paralogues chez *Streptomyces avermitilis*, alors que les espèces du complexe *M. tuberculosis* n'en présentent qu'un seul. De façon intéressante, un des paralogues présents chez *Thermosynechococcus* (tl1329) possède un troisième domaine FHA, positionné entre les deux domaines FHA qui sont communs avec Rv1747. En revanche, cette région chez Rv1747 (acides aminés 98-224, cf. fig. 24A) est extrêmement riche en prolines (21%) et glycines (15%). Ceci est vrai également pour ses autres homologues, dont quelques-uns possèdent également une proportion importante de glutamines dans ce segment.

Les régions riches en prolines semblent être très importantes dans les interactions protéine-protéine. Plusieurs domaines ont été identifiés qui sont spécialisés dans la reconnaissance de peptides riches en prolines, tels que les domaines SH3 ou les domaines WW. La rigidité relative des segments polyproline a pour conséquence une faible perte d'entropie conformationnelle lors de la liaison à d'autres protéines, ce qui favorise leur interaction avec des partenaires. En même temps, ces types de liaison à bas coût entropique se caractérisent par une faible stabilité, de telle sorte que les séquences riches en proline interviennent souvent dans le recrutement rapide et le rapprochement de protéines en vue de l'initiation d'une cascade de réactions subséquentes. De façon intéressante, les régions riches en proline contiennent souvent des résidus de sérine ou thréonine, qui représentent fréquemment des cibles phosphorylables. Leur phosphorylation peut notamment réguler l'interaction de ces régions riches en proline avec les protéines partenaires (Kay *et al.* 2000).

Organisme	Protéine	% Identité	% Similitude
<i>Mycobacterium smegmatis</i> MC2	MSMEG_1642	76.5	84.4
<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	RHA1_ro08536	55.4	71.2
<i>Nocardia farcinica</i> IFM10152	nfa8640	52.8	68
<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	SAV1159	41.6	57.8
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	SCO1806	39.4	56.8
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> BP-1	tl1329	34.8	55.6
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	sl10778	33.3	54.1

**Tableau 9. Homologues proches du transporteur Rv1747.** L'identification d'homologues et la détermination du degré d'identité/similitude ont été réalisées sur le serveur *Comprehensive Microbial Resource* (<http://cmr.jcvi.org/>). Des homologues ont pu être identifiés chez les actinobactéries et les cyanobactéries. Les protéines listées possèdent, comme Rv1747, deux domaines FHA à l'exception de tl1329, qui en présente trois (cf. texte).

**Figure 25. Alignement des régions génomiques de *rv1747* et de ses homologues**, réalisé sur le serveur *Comprehensive Microbial Resource* (<http://cmr.jcvi.org/>). Le gène *rv1747* et ses homologues sont représentés en noir, le gène de la sérine/thréonine kinase *pknF* et ses homologues sont encadrés en rouge. Chez *M. smegmatis*, l'homologue de *pknF* (Msmeg3677, cf. texte) ne se trouve pas à proximité du gène du transporteur.



### La phosphorylation de Rv1747 par PknF

Comme montré dans la figure 25, le gène *rv1747* se trouve localisé dans le génome de *M. tuberculosis* en position 3' du gène de la STPK PknF, ces deux gènes formant vraisemblablement un opéron. La même architecture est retrouvée chez les autres espèces du complexe *M. tuberculosis*. Chez *M. avium*, la contiguïté des deux gènes est conservée, mais le sens de transcription est différent. Chez *Streptomyces avermitilis* et *Synechocystis sp.* un troisième gène sépare les homologues de *rv1747* et *pknF*, alors que chez les autres espèces examinées le gène de la STPK n'est pas à proximité du gène du transporteur (cf. fig. 25).

En purifiant les domaines cytoplasmiques de PknF et Rv1747 de *M. tuberculosis*, le groupe de Virginie Molle a montré que la kinase est capable de phosphoryler le transporteur *in vitro*, et que cette phosphorylation est abolie quand des résidus conservés des deux domaines FHA de Rv1747 (résidus R, S, et N indiqués dans la fig. 24) sont mutés (Molle *et al.* 2004). Cela indique que la phosphorylation de Rv1747 par PknF dépend de l'interaction entre le transporteur et la kinase via les domaines FHA de Rv1747.

Le profil d'autophosphorylation de PknF a été déterminé *in vitro* en utilisant le domaine cytosolique purifié, identifiant deux régions principalement phosphorylées : la boucle d'activation<sup>9</sup> et la région proche de la membrane (Duran *et al.* 2005). La délétion de cette dernière région ne modifie pas la capacité de PknF à phosphoryler la protéine basique de la myéline<sup>13</sup>, ce qui suggère que l'autophosphorylation de PknF sur son segment juxtamembranaire n'est pas indispensable à son activité kinase. Dans la boucle d'activation,

<sup>13</sup> La protéine basique de la myéline (MBP) est une protéine facilement phosphorylable, ce qui fait d'elle un substrat couramment utilisé pour l'étude des kinases *in vitro*.

PknF s'autophosphoryle sur deux thréonines (T173 et T175 ; Duran *et al.* 2005). La mutation en alanine des résidus correspondants chez PknB ou leur déphosphorylation abolit son interaction avec le substrat GarA (Villarino *et al.* 2005). Une étude par double-hybride adressant l'interaction entre PknF et Rv1747 a confirmé un rôle équivalent pour les thréonines de la boucle d'activation de PknF: l'interaction PknF-Rv1747 est sensiblement affaiblie par la mutation T175A et complètement abolie par la mutation T173A (Curry *et al.* 2005).

### Rôle physiologique de Rv1747 et PknF

Le groupe de Buxton a étudié le phénotype du mutant de délétion  $\Delta rv1747$  de *M. tuberculosis* après injection dans la souris (Curry *et al.* 2005). Alors que sa croissance n'est pas affectée en milieu de culture (*in vitro*), le mutant  $\Delta rv1747$  est atténué *in vivo* : il est capable de persister dans la souris, mais la charge bactérienne retrouvée dans les poumons et la rate est 10-fois moins importante qu'après injection de *M. tuberculosis* sauvage. En plus, la croissance du mutant  $\Delta rv1747$  est empêchée dans des macrophages et des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse murine. Ce type de mutant correspond ainsi à la catégorie *giv* (*growth in vivo*) énoncée par Hingley-Wilson *et al.* (2003). Des mutations appartenant à cette catégorie concernent, entre autres, (i) la délétion du système de transduction à deux composants PhoP-PhoQ (Perez *et al.* 2001), qui contrôle la biosynthèse de lipides complexes de la paroi cellulaire (Gonzalo Asensio *et al.* 2006) ; (ii) la délétion du transporteur RND MmpL7 (cf. tableau 8), qui semble impliqué dans l'export d'un autre lipide complexe de la paroi, le dimycocerosate de pthiocerol (Cox *et al.* 1999), et qui pourrait être un substrat de PknD (Perez *et al.* 2006).

De même, un travail récent permet d'envisager pour Rv1747 un rôle dans la biosynthèse de la paroi cellulaire. Un profil altéré de glycopeptidolipides<sup>14</sup> en surface a été notamment observé suite à la surexpression de l'homologue de PknF (Msmeg3677) chez *M. smegmatis* (Gopalaswamy *et al.* 2008), suggérant que Rv1747 pourrait intervenir dans l'export de ces composants de la paroi. Dans l'inventaire des transporteurs réalisé par Paulsen (Ren *et al.* 2004), un substrat apparenté a été prédit pour Rv1747 : les lipooligosaccharides<sup>14</sup>.

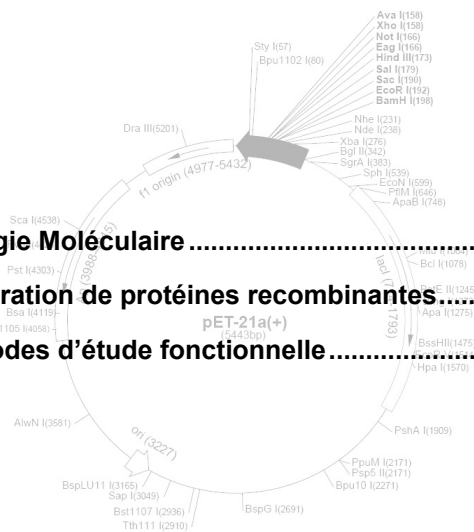
D'autre part, une étude sur *M. tuberculosis* a montré que l'inhibition de l'expression de PknF (en utilisant des ARN antisens) résulte en une croissance altérée et des cellules plus courtes avec des septa anormaux (Deol *et al.* 2005). Ces auteurs ont également observé une forte accumulation de glucose suite à l'inhibition de PknF, mais des expériences approfondies réalisées dans le groupe de Buxton n'ont pas permis de confirmer cette observation (communication personnelle).

<sup>14</sup> Les glycopeptidolipides (GPL) et lipooligosaccharides (LOS) constituent les antigènes majeurs de *Mycobacterium*. Les GPL possèdent typiquement un noyau d'acides gras C<sub>26-34</sub> hydroxylés ou méthoxylés en position 3, amidés par le tripeptide D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala et terminés par le L-alaninol. La définition des LOS est plus floue : il s'agit de lipides contenant du trehalose et sensibles au traitement alcalin (Etienne *et al.* 2005).

Finalement, l'homologue de PknF chez la cyanobactérie *Synechocystis sp.* (Sll0776, cf. fig. 25) a été récemment étudié. Les propriétés du mutant  $\Delta$ sll0776 suggèrent que cette kinase pourrait être impliquée dans la régulation des concentrations des métabolites du cycle de Krebs en fonction de la présence de carbone inorganique dans le milieu extracellulaire (Laurent *et al.* 2008). Etant donné la capacité de *Synechocystis* à réaliser la photosynthèse, il est possible que cette bactérie ait développé des réseaux spécialisés de signalisation et que la fonction de l'homologue de PknF ait divergé considérablement. Le taux d'identité entre Sll0776 et PknF n'est en effet pas très élevé (17% d'identité et 34% de similitude).

# MATERIELS ET METHODES

<b>Biologie Moléculaire .....</b>	<b>83</b>
<b>Préparation de protéines recombinantes .....</b>	<b>92</b>
<b>Méthodes d'étude fonctionnelle .....</b>	<b>104</b>







## BIOLOGIE MOLECULAIRE

## Souches bactériennes

Souche	Génotype / Description	Source
<i>Escherichia coli</i> XL1Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] utilisée pour clonage à cause des mutations dans les systèmes de recombinaison ( <i>rec</i> ) et restriction ( <i>end</i> , <i>hsd</i> ) ; possibilité de sélection blanc/bleu grâce au gène <i>lacIqZΔM15</i> sur l'épisme F'	Stratagene
TOP10	F' <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG</i> utilisée pour le clonage de produits PCR dans pCR Blunt (cf. plasmides)	Invitrogen
GM2163	F' <i>dam-13::Tn9 (Cam<sup>r</sup>) dcm-6 hsdR2 (r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) leuB6 hisG4 thi-1 araC14 lacY1 galK2 galT22 xylA5 mtl-1 rpsL136 (Str<sup>r</sup>) fhuA31 tsx-78 glnV44 mcrA mcrB1</i> utilisée pour l'obtention d'ADN non méthylé ( <i>dam</i> <sup>-</sup> et <i>dcm</i> <sup>-</sup> )	New England Biolabs
BL21(DE3)	F', <i>hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>), dcm, gal, lon, ompT</i> , prophage <i>λDE3</i> contenant le gène de la T7 ARN polymérase sous le contrôle du promoteur <i>lacUV5</i> ; délétion des protéases Lon et OmpT utilisée pour la surexpression de protéines	Novagen
B834(DE3)	mutant dérivé de BL21(DE3) auxotrophe pour la méthionine	Novagen
C41(DE3)	mutant dérivé de BL21(DE3), mutation sur le promoteur <i>lacUV5</i> de la T7 ARN polymérase, accumulation d'ARNm plus lente	J.E. Walker (Angleterre)
C43(DE3)	mutant dérivé de C41(DE3), expression retardée de la lactose perméase ( <i>LacY</i> ), responsable de l'entrée d'IPTG dans la cellule	Miroux <i>et al.</i> 1996; Wagner <i>et al.</i> 2008
Rosetta(DE3)	dérivé de BL21(DE3) portant le plasmide pRare (cf. plasmides)	Novagen
TG1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>-</sup>)</i> [F' <i>traD36 proAB lacIqZΔM15</i> ]	T. Tsuchiya (Japon)
KAM32	mutant dérivé de TG1, transporteurs de multiples drogues YdhE et AcrAB inactivés	Chen <i>et al.</i> 2002
KZM120	<i>ΔacrAB::Tn903kan<sup>r</sup></i> mutant dérivé de K-12, transporteur AcrAB inactivé	Ma <i>et al.</i> 1995
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	Institut Pasteur
<i>ΔyheI/yheH</i>	<i>trpC2, ΔyheI/yheH, spc</i> ; disruption des gènes <i>yheI/yheH</i> par recombinaison homologue, introduisant une cassette de résistance à la spectinomycine entre les nucléotides 421 de <i>yheI</i> et 1650 de <i>yheH</i>	F. Denizot (Marseille)

## Conditions de culture

Milieu	Composition
Luria-Bertani (LB)	10 g/l bactotryptone ( <i>Difco</i> ), 5 g/l extrait de levure ( <i>Difco</i> ), 10 g/l NaCl, ou formulation mélangée achetée chez <i>Sigma</i>
Mueller Hinton	2 g/l infusion déshydratée de viande de bœuf, 1.5 g/l amidon de maïs et 17,5 g/l peptone de caséine ; formulation mélangée achetée chez <i>Fluka</i> Milieu préconisé pour les tests de sensibilité aux antibiotiques
TurboBroth™ (TB)	Composition brevetée par <i>AthenaES</i> , incluant du glycérol comme source carbonée et tamponné à pH 7.2 avec du phosphate de potassium. Ce milieu permet une croissance jusqu'à des densités bactériennes 4-5 fois plus élevées que le milieu LB et est recommandé pour l'expression de protéines recombinantes chez <i>E. coli</i> <sup>15</sup>

<sup>15</sup> [www.athenaes.com/TurboBroth.php?osCsid=f0460f9d689a437cebfd222df9d2038a](http://www.athenaes.com/TurboBroth.php?osCsid=f0460f9d689a437cebfd222df9d2038a)

Les cultures de *B. subtilis* et celles d'*E. coli* destinées à des fins de clonage ou mutagenèse ont été réalisées dans du milieu LB à 37°C. La surexpression de protéines, sauf précisé autrement, a été effectuée dans du milieu TurboBroth, en incubant la culture bactérienne à 37°C jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 1.8-2, puis à 25°C pendant 6 heures après ajout d'IPTG 0.7 mM. En fonction des déterminants de résistance des plasmides ou souches (cf. « Constructions » et « Souches bactériennes »), des antibiotiques ont été ajoutés aux concentrations suivantes : 100 µg/ml ampicilline, 50 µg/ml kanamycine, 40 µg/ml chloramphénicol, 100 µg/ml spectinomycine.

## *Techniques de Biologie Moléculaire*

### **Préparation et transformation de bactéries compétentes**

Les bactéries peuvent être rendues compétentes par un traitement au chlorure de calcium, qui aurait un effet perméabilisant sur la membrane et permettrait l'incorporation d'ADN exogène par la bactérie. Ce traitement a été réalisé comme suit: une colonie est ensemencée dans 5 ml de milieu LB, qui sont ensuite incubés pendant la nuit à 37°C. 1 ml de cette culture est inoculé le lendemain dans 200 ml de LB et cultivé à 37°C jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de ~0.4. La culture est alors refroidie 15 minutes dans la glace et centrifugée ensuite à 4000  $xg$ , 4°C pendant 7 minutes. Le culot bactérien est repris dans 40 ml 0.1 M  $MgCl_2$  stérile et froid, et la suspension est incubée 15 minutes dans la glace. Après centrifugation dans les mêmes conditions, le culot est repris dans 4 ml de 0.1 M  $CaCl_2$  stérile et froid et incubé une heure dans la glace. Après ajout de glycérol stérile à une concentration finale de 15%, la suspension bactérienne est aliquotée par fractions de 100-200 µl, qui sont congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

Pour la transformation des bactéries, une aliquote de bactéries compétentes est décongelée dans la glace pendant 10 minutes avant d'ajouter 0.5-1 µl de plasmide purifié (typiquement à 1 µg/µl) ou 10-20 µl d'une réaction de ligation. Après une incubation de 30 minutes dans la glace, un choc thermique est réalisé pendant 45 secondes à 42°C. Les bactéries sont remises dans la glace pendant 2 minutes avant d'ajouter 500 µl de LB et d'incuber l'ensemble sous agitation à 37°C. Des volumes variables sont étalés sur boîte de Pétri contenant du LB avec 1.5% agar, éventuellement 1% (w/v) glucose et antibiotique aux concentrations détaillées dans la section « Conditions de culture ». Ces boîtes sont incubées pendant la nuit à 37°C ou, alternativement, 2-3 jours à température ambiante.

### **Préparation d'ADN plasmidique**

Les plasmides sont amplifiés dans des souches d'*E. coli* déficientes en enzymes de recombinaison et restriction (XL1Blue, TOP10 ou GM2163, cf. « Souches bactériennes ») en présence de l'antibiotique de sélection, puis isolés après lyse alcaline des bactéries (Birnboim

*et al.* 1979). Pour préparer de faibles quantités de plasmide (« minipréparation », avec un rendement de 1-10 µg d'ADN), le culot de 1-2 ml de culture bactérienne saturée est repris dans 200 µl de solution I, puis 200 µl de solution II sont ajoutés. Après ~5 minutes d'incubation à température ambiante, 200 µl de solution III sont ajoutés et le tout est centrifugé pendant 10 minutes à ~15000 *xg* pour éliminer le précipité formé entre SDS, protéines et ADN chromosomique. Le surnageant contient l'ADN plasmidique et l'ARN si la digestion par la RNase n'a pas été totale. Les acides nucléiques sont ensuite précipités en ajoutant 0.6 volumes d'isopropanol et en centrifugeant à ~15000 *xg* pendant 20 minutes à 4°C. Le culot est lavé à l'éthanol 70% froid et l'ADN est resuspendu dans de l'eau distillée.

Solution I : 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8, 20-100 µg/ml RNase; conservation à 4°C

Solution II : 200 mM NaOH, 1% SDS ; conservation à température ambiante

Solution III : 3 M acétate de potassium pH 5,2 ; conservation à température ambiante

Pour préparer des quantités de plasmide plus élevées (« midipréparations », rendement typique entre 10 et 100 µg d'ADN), les kits JETSTAR (*Genomed*) ou PhoenIX™ (*MP Biochemicals*) ont été utilisés. La lyse bactérienne est réalisée selon le même principe, mais l'ADN plasmidique est ensuite accroché sur une colonne d'échange anionique. Suite au lavage de la colonne, l'ADN est élué avec une solution à forte concentration saline (1.25 M NaCl) et soumis, comme précédemment, à une précipitation à l'isopropanol et à un lavage à l'éthanol 70%. En plus du rendement plus élevé, l'ADN obtenu d'une midipréparation est de meilleure qualité grâce à l'étape de purification supplémentaire sur colonne d'affinité.

La concentration des préparations d'ADN a été déterminée spectrophotométriquement, une unité d'absorbance à 260 nm correspondant à 50 µg d'ADN/ml.

### **Electrophorèse des fragments d'ADN**

Pour la visualisation des molécules d'ADN, elles sont soumises à une migration dans un champ électrique au sein d'un gel d'agarose. Le gel agit comme tamis moléculaire permettant de séparer les molécules d'ADN en fonction de leur taille. La concentration d'agarose est choisie entre 0.8 et 1.5% en fonction de la taille des fragments à résoudre. La quantité d'agarose (*DNA Grade, Euromedex*) souhaitée est dissoute dans du tampon TAE 0.5x (20 mM Tris-Acetate, 0.5 mM EDTA, pH ~8.3) en chauffant aux microondes. Après refroidissement de la solution, du bromure d'éthidium (*Gibco*) est ajouté à une concentration finale de 0.5 µg/ml et la solution est versée dans un support horizontal pour sa solidification. Les échantillons d'ADN sont mélangés avec 1/5 du volume de tampon de dépôt 6x (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.03% bromophénol blue, 0.03% xylène cyanol FF, 60% glycérol, 60 mM EDTA ; *Fermentas*) avant d'être déposés dans le gel. La migration est effectuée à 100 V dans du tampon TAE 0.5x, et les bandes sont visualisées en irradiant ensuite le gel à 254 nm pour exciter la fluorescence de l'éthidium intercalé dans l'ADN (maximum d'émission vers 600 nm).

## Restriction et ligation

Les réactions de restriction ont été réalisées selon les indications du fournisseur des enzymes (*Fermentas*, *New England Biolabs*). La purification des fragments a été effectuée après migration sur gel d'agarose et excision de la bande correspondante, en utilisant le kit GENECLAN Turbo (*MP Biomedicals*). Ce même kit peut être utilisé pour purifier l'ADN en solution et changer de tampon, si ceci est nécessaire afin de réaliser une digestion sérielle avec des enzymes dont les tampons préconisés ne sont pas compatibles.

La ligation de fragments d'ADN (typiquement plasmide et insert) a été faite en présence de la T4 DNA ligase (*Fermentas* ou *Invitrogen*) selon les recommandations du fournisseur.

## Amplification d'ADN par PCR (*polymerase chain reaction*)

L'amplification de fragments pour le clonage subséquent a été réalisée avec la polymérase Pfu (*Fermentas*) en utilisant 0.1-100 ng d'ADN (qualité « midipréparation »), 0.8  $\mu$ M oligonucléotides, 400  $\mu$ M de chaque nucléotide triphosphate, 25-50 mU d'enzyme/ $\mu$ l, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 10 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA et 2 mM  $\text{MgSO}_4$ . Après une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes, 30 cycles de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 30 secondes à 55°C (hybridation) et 45 secondes à 72°C (élongation) sont réalisés. Une étape d'élongation de 10 minutes à 72°C est rajoutée à la fin de ces 30 cycles.

Afin d'incorporer le fragment amplifié dans le vecteur désiré, il peut être digéré et sous-cloné directement ou après un clonage intermédiaire dans le vecteur pCR-Blunt. Ce clonage (réalisé selon les indications du kit Zero Blunt ; *Invitrogen*) permet de garder le fragment obtenu par PCR pour une utilisation répétée. Le système Zero Blunt a l'avantage de sélectionner négativement les bactéries TOP10 transformées avec un plasmide vide, car celui-ci entraîne l'expression d'une protéine létale (CcdB) pour ces bactéries. Les plasmides finalement obtenus sont purifiés en faisant une midipréparation et analysés par restriction et séquençage.

Pour la vérification des clonages, des réactions d'amplification ont été réalisées par l'enzyme Taq polymérase (*Fermentas*), qui est 6-fois moins fidèle que la polymérase Pfu. Des colonies transformées sontensemencées dans 1 ml de LB et mises en culture à 37°C et la réaction de PCR est réalisée une heure après en utilisant 1  $\mu$ l de ces cultures comme matrice, ainsi que 0.8  $\mu$ M oligonucléotides, 400  $\mu$ M de chaque nucléotide triphosphate, 20 mU d'enzyme/ $\mu$ l, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.01% (v/v) Tween 20 et 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Les conditions de réaction (temps et température) sont identiques à celles décrites précédemment.

Les différents protocoles utilisés pour la mutagenèse dirigée (faisant appel en partie à des techniques de PCR) sont décrits en détail ci-après.

## Constructions

## Oligonucléotides

Utilisés pour les clonages et la délétion de *yheI/yheH*

	Séquence (5'>3'), site de restriction en italique
1 YheI 5'NheI	CGACCGCTAGCTTTTCAGTTTTGAAAAAGCTTGGCTGGTT (NheI)
2 YheH 3'XhoI	CGACCCCTCGAGTGCAATGGAATGTTTCTGTCCCTTTTGCA (XhoI)
3 YheI 5'BamHI	AAGGATCCGTTTTTCAGTTTTGAAAAAGCTTGGCTGG (BamHI)
4 YheI 3'XhoI	AACTCGAGTGCCCCCTGCTCCCCCTTCTTCCGC (XhoI)
5 YheH 5'BamHI	AAGGATCCGAAAATAGGAAAAACGTTATGGAG (BamHI)
6 YheH 3'XhoI	AACTCGAGTGCAATGGAATGTTTCTGTCCC (XhoI)
7 YheI 5'XhoI	CTCGAGTTTTTCAGTTTTGAAAAAGCTTGGCTGG (XhoI)
8 YheI 3'BamHI	GGATCCTCATGCCCCCTGCTCCCCCTTCTTCCGC (BamHI)
9 YheI 5'EcoRI	AAGAATTCGTTTTTCAGTTTTGAAAAAGCTTGGC (EcoRI)
10 YheH 3'Sall	GGTCGACGCAATGGAATGTTTCTGTCCCTTTTG (Sall)
11 2rspec1	CCAGGAGGGCACGGATAACTAATAACGTAACGTGACTGG
12 2rspec2	CCGACACAGCCAAGCTACCAATTAGAATGAATATTTCCC
13 Yheih1	GCGTCTTCGCGGCCAGGCGTACTGGCTGCGCTATACG
14 Yheih2	TCCGTGCCCTCCTGGACAACGTAACGTCAAGATGCC
15 Yheih3	GCTTGGCTGTGTGCGGAAGCTTCCGAAGGGCATTTAATGAGC
16 Yheih4	CGCTGCGTTCGGTTGAGGAATGTTTCTGTCCCTTTGC
17 Rv1747_5'	TATGGATCCGGTGCCGATGAGCCAACCAGCC (BamHI)
18 Rv1747_3'	TATAAGCTTCAGCACGCCTTGAGGCGAATCTTCC (HindIII)
19 Rv1747_3'c	ATAGCGGCCGCGCACGCCTTGAGGCGAATCTTCC (NotI)
20 Rv1747_5'b	TATGGATCCGTGCCGATGAGCCAACCAGCC (BamHI)
21 Rv1747_3'b	TATAAGCTTCAGTCGTCGGCGACGGTGCTGAAG (HindIII)

## Utilisés pour la mutagenèse dirigée:

Mutation	Séquence (5'>3'), les bases correspondant à la mutation sont sous-lignées
22 YheI K377A	GTAAAACCGGTAGCGGAGCAACGACAATTATTAAGCAGC (AgeI) <sup>1</sup>
23 YheH K469A	GGCCATACCGGATCAGGAGCTAGCTCGATTTTGAATCTTC (NheI) <sup>1</sup>
24 YheI H531A	GAAAAACGACATTTATTTTGACAGCCCGATTATCCGCGGTAGAGCACG
25 YheH H623A	CGCACCACCTTCGTCATCGCTGCCCGGCTTTCAACAATCAGAAAT
26 YheI D500E	CGGAAATCTTGATTCTGGATGAAATCACTTTCCGCTGTAGATG
27 YheH E592D	GCGATCTTGATTTTAGATGACGCAACGGCGCATATTGATACA
28 Rv1747 K358A_5'	TCGGGCGCTGGCGCGTCGACACTTGCC
29 Rv1747 K358A_3'	GGCAAGTGTCGACGCGCCAGCGCCCGACGG
30 Rv1747 E479Q	GATCCTCGACCAGCCGACATCCG

<sup>1</sup> nouveau site de restriction apporté par l'oligonucléotide (marqué en italique sur la séquence)

### Plasmides utilisés

Plasmide	Promoteur	Insert	Etiquette	Clivage	Antibiotique sélection	Origine réplication	Source
pET15b	T7 <sub>lac</sub>		His <sub>6</sub> N-ter	thrombine	ampicilline	pBR322	Novagen
pET19b	T7 <sub>lac</sub>		His <sub>6</sub> N-ter	entéro-kinase	ampicilline	pBR322	Novagen
pET21b	T7 <sub>lac</sub>		His <sub>6</sub> C-ter		ampicilline	pBR322	Novagen
pETSIG	T7 <sub>lac</sub>	peptide signal d'OmpA	His <sub>6</sub> N-ter	thrombine	ampicilline	pBR322	Siroy <i>et al.</i> 2005
pGEX(M) <sup>1</sup>	P <sub>lac</sub>		GST <sup>2</sup>	thrombine	ampicilline	pBR322	Molle <i>et al.</i> 2004
pUC18	P <sub>lac</sub>				ampicilline	pBR322	Fermentas
pCR-Blunt	P <sub>lac</sub>	gène létal <sup>3</sup> <i>lacZ</i> α- <i>ccdB</i>			kanamycine, zéocine	pBR322	Invitrogen
pEXP1-GW- <i>lacZ</i>	T7	β-galactosidase ( <i>lacZ</i> )	His <sub>6</sub> N-ter Xpress épitope	entéro-kinase	ampicilline	pBR322	Invitrogen
pRare		ARNt des codons AUA, AGG, AGA, CUA, CCC et GGA			chlor-amphénicol	p15A	Novagen
pREP4groESL	P <sub>lac</sub>	Chaperonnes GroES et GroEL d' <i>E. coli</i>			kanamycine	p15A	Amrein <i>et al.</i> 1995
pT-Trx	T7	Thiorédoxine d' <i>E. coli</i>			chlor-amphénicol	p15A	Yasukawa <i>et al.</i> 1995

<sup>1</sup> plasmide pGEX-4T-1 (*GE Healthcare*) avec un fragment additionnel *EcoRI/BamHI* de 321 paires de bases provenant de pET19b (introduisant un site *HindIII* dans le site de multiclonage ; Molle *et al.* 2004)

<sup>2</sup> glutathion-S-transférase

<sup>3</sup> en absence de *ccdB* (codé par l'épisome F)

### Clonages et sous-clonages

Les constructions suivantes étaient disponibles au début de ce travail:

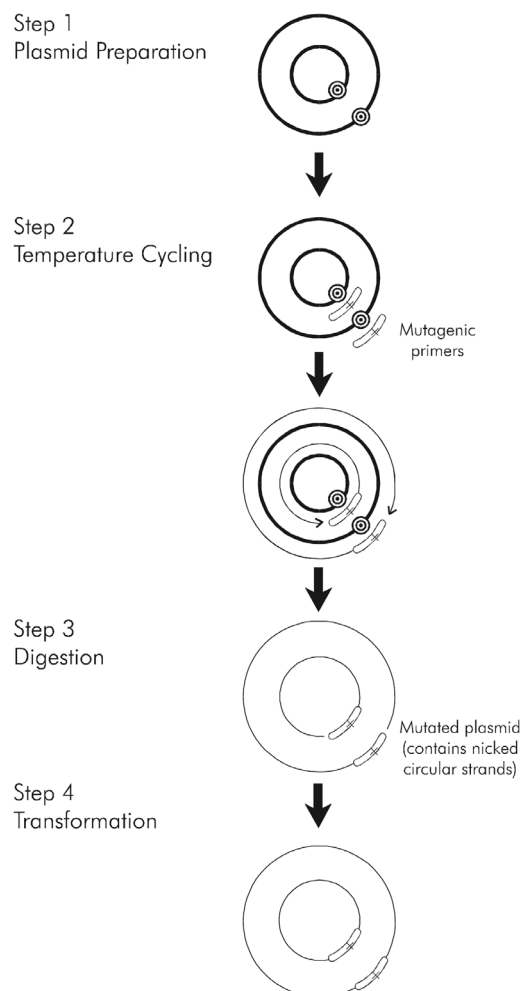
Etude	Construction	amplification par PCR avec oligonucléotides	insertion dans le plasmide	par digestion avec	réalisé par
Yhel/YheH	21ih	1/2	pET21b	NheI/XhoI	C. Torres
	21i	3/4	pET21b	BamHI/XhoI	
	21h	5/6	pET21b	BamHI/XhoI	
	15i	7/8	pET15b	XhoI/BamHI	
	18ih	9/10	pUC18	EcoRI/SalI	
Rv1747	19rv	17/18	pET19b	BamHI/HindIII	V. Molle
	19rvNbd	17/21	pET19b	BamHI/HindIII	
	GSTrvNbd	20/21	pGEX(M)	BamHI/HindIII	
	SIGrv	17/18	pETSIG	BamHI/HindIII	

En plus des constructions détaillées dans la section suivante, les clonages suivants ont été réalisés lors de ce travail :

Etude	Construction	amplification par PCR avec oligonucléotides	insert provenant de la construction	insertion dans plasmide	par digestion avec
Rv1747	21rvStop	-	19rv	pET21b	NdeI/HindIII
	21rv6xHis	28/19	-	21rvStop	KpnI/NotI
	EXPrv	-	19rv	pEXP1-GW- <i>lacZ</i>	XbaI/HindIII

## Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été principalement réalisée selon la méthode “QuikChange” développée par *Stratagene*. Cette méthode sert à introduire dans un plasmide des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions d’acides aminés; ces mutations sont portées par des paires d’oligonucléotides complémentaires qui servent d’amorce pour synthétiser des brins complémentaires à ceux du plasmide matrice non muté (cf. schéma ci-contre). A la différence d’une réaction classique de PCR, il n’y a pas d’amplification exponentielle du plasmide d’origine, parce que seul celui-ci peut servir de matrice (et non pas les brins complémentaires synthétisés qui ne sont pas circulaires). Il est important que la polymérase utilisée ne puisse pas déplacer l’oligonucléotide après avoir complété le brin pour que tous les brins synthétisés portent la mutation désirée. Afin de distinguer l’ADN matrice de celui muté, la matrice utilisée doit être isolée d’une souche *dam*<sup>+</sup>. La DNA adénine méthylase (*dam*) méthyle notamment les séquences GATC dans la position N<sup>6</sup> de l’adénine. Cette même séquence est reconnue et coupée (G<sup>m6</sup>A<sup>+</sup>TC) par l’endonucléase DpnI si l’adénine est méthylée sur un ou sur les deux brins. Ainsi, un traitement avec DpnI après la réaction de synthèse permet d’éliminer le plasmide original et seulement les plasmides mutés sont ensuite transformés dans les bactéries. Les coupures simple brin sont réparées dans les bactéries transformées, permettant l’amplification des plasmides.



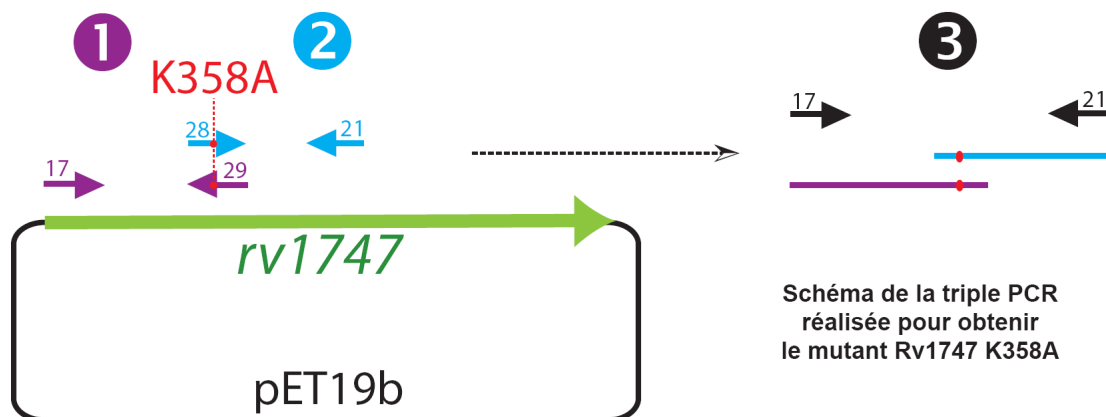
La réaction de mutagenèse est faite dans un volume de 50 µl, contenant 100 ng de chaque oligonucléotide, 50 ng du plasmide matrice, 2.5 U de polymérase PfuTurbo (*Stratagene*), 500 µM de chaque nucléotide triphosphate, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100 et 0.1 mg/ml BSA. Après une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 1 minute, 16 cycles de 30 secondes à 95°C (dénaturation), 1 minute à 58°C (hybridation) et 10 minutes à 68°C (élongation) sont réalisés. 10 U de DpnI (*Fermentas*) sont ajoutés pour la digestion de l’ADN matrice (méthylé) effectuée à 37°C pendant une heure. 1-10 µl de ce mélange sont transformés dans des cellules XL1Blue compétentes. L’ADN obtenu est vérifié par séquençage et restriction (exploitant, le cas échéant, le nouveau site de restriction introduit par la mutagenèse).

Les **simples mutants** **YheI\_K377A**, **YheH\_K469A**, **YheI\_H531A**, **YheH\_H623A**, **YheI\_D500E** et **YheH\_E592D** ont été obtenus par cette méthode en utilisant le plasmide 21ih comme matrice et les oligonucléotides 22-27 (plus leur complémentaire inverse). Pour la construction du **double mutant** **YheI\_K377A/YheH\_K469A**, le fragment **MscI/XhoI** de **YheH\_K469A** a été inséré dans le plasmide **YheI\_K377A**. (Même procédé pour le **double mutant** **YheI\_D500E/YheH\_E592D**). Le **double mutant** **YheI\_H531A/YheH\_H623A** a été obtenu par mutagenèse dirigée du plasmide **YheI\_H531A**, en utilisant l'oligonucléotide 25 et son complémentaire inverse.

Le mutant **E479Q de Rv1747** (dans le plasmide **GSTrvNbd**) avait été obtenu par le Dr. V. Molle (IBCP, Lyon ; Molle *et al.* 2004) en faisant une double PCR : d'abord avec les oligonucléotides 30/21 et ensuite avec ce produit et l'oligonucléotide 17. Le fragment ainsi obtenu a été digéré avec **BamHI** et **HindIII** et inséré dans **pGEX(M)**, résultant en la construction **GSTrvNBD\_E479Q**. Pour introduire la mutation dans la séquence du transporteur entier et celle du **His<sub>6</sub>-NBD**, le fragment **NspV/SexAI** des constructions 19rv et 19rvNbd a été remplacé par celui de **GSTrvNBD\_E479Q**.

La mutation **Rv1747\_K358A** s'est avérée irréalisable par la méthode « QuikChange ». Ce mutant a été donc construit par une triple PCR. Une double PCR 1+3 ou 2+3 (cf. schéma ci-dessous) n'a pas permis non plus l'obtention du mutant. La polymérase utilisée a été **ISIS (MP Biochemicals)**, car elle supporte des températures jusqu'à 97°C sans perte significative d'efficacité. La dénaturation à 97°C a été nécessaire à la réussite de la mutagenèse vraisemblablement à cause du contenu élevé en G+C de la séquence.

Dans un premier temps (étapes 1 et 2, cf. schéma ci-dessous), des sous-fragments ont été amplifiés à partir de la construction 19Rv avec les oligonucléotides 17/29\* et 28\*/21 (\*oligonucléotides contenant la mutation désirée). Les conditions suivantes ont été choisies : 15 pmol de chaque oligonucléotide, 50 ng d'ADN matrice, 100 µM de chaque nucléotide triphosphate, 1 U de la polymérase **ISIS**, 20 mM **Tris-HCl** pH 9.0, 25 mM **KCl**, 10 mM **(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**, 1.5 mM **MgSO<sub>4</sub>**, 0.1% **Tween 20** et 0.1 mg/ml **BSA**. Après une étape initiale de dénaturation à 97°C pendant 5 minutes, 30 cycles de 30 secondes à 97°C (dénaturation), 30 secondes à 60°C (hybridation) et 2 minutes à 72°C (élongation) ont été réalisés.





Dans un deuxième temps, ces fragments ont été purifiés en utilisant le kit GENECLAN Turbo (*MP Biomedicals*) et utilisés pour une réaction d'hybridation entre eux et élongation subséquente, ainsi que d'amplification du fragment résultant avec les oligonucléotides 17/21 (étape 3, cf. schéma page précédente). La composition du mélange réactionnel a été identique à celle détaillée ci-dessus, avec deux modifications : 50 pmol de chaque oligonucléotide et comme ADN matrice les fragments obtenus dans la première étape (0.8% du volume après purification). La réaction a comporté une étape initiale de dénaturation à 97°C pendant 2 minutes, suivie de 15 cycles d'une minute à 97°C (dénaturation) et 4 minutes à 72°C (hybridation et élongation). Une étape finale d'élongation a été réalisée à 72°C pendant 10 minutes. Une température d'hybridation élevée (72°C) a été choisie pour diminuer les appariements non spécifiques. Le fragment final ainsi obtenu a été inséré dans le plasmide 19Rv après digestion par *AgeI*, résultant en la construction 19Rv\_K358A. L'introduction de la mutation ainsi que l'intégrité de la séquence ont été vérifiées par séquençage.

### **Délétion des gènes *yheI* et *yheH***

Un mutant de délétion  $\Delta yheI/yheH$  de *Bacillus subtilis* 168 a été réalisé par le laboratoire du Dr. F. Denizot (Marseille). Le fragment génomique allant du nucléotide 421 de *yheI* jusqu'au nucléotide 1650 de *yheH* a été remplacé par une cassette de résistance à la spectinomycine (contenant le gène de la spectinomycine adényltransférase *aad9*). La disruption a été réalisée selon le protocole décrit précédemment (Bernard *et al.* 2003), à l'aide des oligonucléotides 11/12, 13/14 et 15/16. Au début de ce travail de thèse, la délétion correcte de *yheI/yheH* dans cette souche a été vérifiée par PCR.

## PREPARATION DE PROTEINES RECOMBINANTES

### *Surproduction analytique*

#### **Expression hétérologue chez *Escherichia coli***

Afin d'optimiser l'expression des protéines et de vérifier leur adressage correct à la membrane, des cultures en petit volume ont été réalisées. Pour cela, des bactéries BL21(DE3) (ou d'autres souches dérivées de celle-ci ; cf. "souches bactériennes") compétentes ont été transformées avec le plasmide d'intérêt et une ou plusieurs colonies ont été utilisées le lendemain pour ensemercer 1-10 ml de milieu LB ou TurboBroth. La culture est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0.6-0.8 (LB) ou 1.8-2 (TurboBroth). L'expression protéique est déclenchée par l'ajout d'IPTG à une concentration finale entre 0.5 et 1 mM, suivi d'une incubation à 25°C ou 37°C entre 3-16 heures. Si besoin, un choc thermique préalable visant l'induction de chaperonnes de stress est réalisé en plaçant la culture à 42°C pendant 30 minutes avant l'ajout d'IPTG.

Pour vérifier le niveau d'expression obtenu, les protéines cellulaires sont soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) suivie, si besoin, d'une immunodétection. Pour cela, 200 µl de culture bactérienne avant et après induction à l'IPTG sont centrifugés pendant 10 minutes à 5000 *xg*. Le culot bactérien peut être repris différemment :

- Avec 50 µl de tampon dénaturant UCB (*urea cracking buffer* : 10 mM  $NaH_2PO_4$ , 1% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol, 1% (w/v) SDS, 5 M urée, pH 7), puis en ajoutant 50 µl de tampon ULB 2x (*urea loading buffer* 2x: 250mM Tris-HCl pH 6.8, 6% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycérol, 10% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.2% (w/v) bleu de bromophénol, 2.5 M urée) avant de déposer sur gel.
- Avec 75 µl de réactif B-PER (*bacterial protein extraction reagent* ; Pierce). Ce réactif contient un détergent doux non-ionique dans un tampon Tris ou phosphate (les deux variantes sont disponibles) et permet de lyser les bactéries sans avoir recours à une disruption mécanique.
- Alternativement, la lyse cellulaire peut être réalisée par sonication. Le culot bactérien est repris par ¼ du volume de culture avec du tampon 50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM  $MgCl_2$  et 1 mM DTT, et ensuite soumis, toujours dans la glace, à 4 cycles de sonication de 15 secondes et 1 minute de repos.

Si besoin, des inhibiteurs de protéases sont ajoutés (5.8 µM leupeptine, 5.8 µM pepstatine, 1 mM fluorure de phénylméthylsulphonyl ou PMSF) et éventuellement 0.1 mg/ml DNase I pour diminuer la viscosité du lysat.

## Expression en système acellulaire

Pour réaliser des tests de synthèse *in vitro*, le système Expressway™ Plus (Invitrogen) a été choisi, qui contient un extrait d'*E. coli* (extrait S-30 ; Zubay 1973), l'enzyme T7 ARN polymérase et un mélange réactionnel optimisé incluant acides aminés et un système de régénération d'ATP. Ce système permet idéalement l'expression de 50 µg de protéine, à partir de promoteurs de type T7 et dans un volume réactionnel de 50 µl.

Le fournisseur de ce système donne des indications assez restrictives concernant la construction d'ADN à utiliser pour une expression optimale. Le plasmide doit contenir, dans l'ordre, un promoteur T7, un site de liaison du ribosome (RBS), la séquence codante et un terminateur T7, avec un espacement entre eux comme indiqué ci-dessous. Ces indications permettraient une durée de vie suffisante de l'ARN transcrit, de même qu'une traduction efficace par le ribosome. Ainsi, afin de réaliser la synthèse *in vitro* du transporteur Rv1747, le plasmide EXPrv a été construit comme indiqué dans la section « Clonages », en respectant toutes ces consignes.



Pour la production des protéines membranaires sous une forme soluble, des détergents sont ajoutés au mélange réactionnel. A partir des études publiées sur l'expression *in vitro* de protéines membranaires (Klammt *et al.* 2005), les détergents Brij 35 et Brij 58 ont été choisis pour cette étude, car ils semblent appropriés pour maintenir solubles des protéines membranaires de taille élevée.

La réaction est réalisée selon les indications du fournisseur, en présence de 0.1% (w/v) Brij 35 ou 0.4% (w/v) Brij 58 et avec les plasmides EXPrv et pEXP1-GW-*lacZ* (comme contrôle) purifiés par midipréparation et resuspendus dans de l'eau sans DNase ni RNase fournie dans le kit. Une incubation à 37°C pendant 2 heures est effectuée sous agitation (290 rpm).

## Tests de solubilité et d'adressage à la membrane

Afin de vérifier la solubilité des protéines produites, une centrifugation du lysat bactérien (préparé comme décrit dans « Expression hétérologue chez *E. coli* ») ou du mélange issu de la synthèse *in vitro* est réalisée à 15000 *xg* pendant 15-30 minutes, de telle sorte que les protéines insolubles se retrouvent dans le culot. Dans le cas des lysats bactériens, les résultats de solubilité peuvent être faussés par une lyse incomplète des bactéries. Pour exclure cette possibilité, on utilise comme contrôle de lyse la chaperonne GroEL (exprimée à partir du plasmide pREP4groESL) qui s'est avérée parfaitement soluble dans les conditions de notre étude: sa présence dans la fraction insoluble témoigne d'un défaut de lyse.

Pour examiner l'adressage des protéines à la membrane, le surnageant de cette première centrifugation est soumis à une deuxième étape de centrifugation d'une heure à

100000  $g$  (e.g. 46000 rpm dans le rotor TLA 100.3). Le culot ainsi obtenu contient la fraction membranaire. Le culot peut être repris dans le même tampon et soumis à une deuxième étape de centrifugation dans les mêmes conditions afin d'éliminer des protéines solubles éventuellement accrochées aux membranes.

La solubilisation de protéines membranaires par différents détergents a été examinée en incubant des préparations de membrane (à une concentration protéique finale de 1-2 mg/ml) avec 1% (w/v) détergent, dans un tampon contenant 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 15% glycérol et 1 mM DTT (éventuellement 10 mM imidazole peuvent être rajoutés pour mimer les conditions utilisées dans le protocole de purification). Après 2 heures d'incubation à 4°C sous agitation, cette solution est centrifugée dans une Airfuge (rotor A-110 ; *Beckman*) à 20 psi pendant 10 minutes (équivalent à 180000  $g$  pendant 1 heure avec le rotor 70 Ti). A l'issue de cette étape de centrifugation, les protéines solubilisées dans le détergent se retrouvent dans le surnageant.

### *Surproduction préparative*

#### **Préparation de vésicules de membrane inversées**

1 litre de milieu TurboBroth avec antibiotique(s) estensemencé avec plusieurs colonies (~8) de BL21(DE3) (YheI/YheH) ou B834(DE3)pRepGroESL (Rv1747) transformées la veille avec le plasmide d'intérêt. La culture est incubée à 37°C sous agitation (225 rpm). Lorsque la  $DO_{600nm}$  atteint 1.8-2 (environ 13 heures plus tard), 0.7 mM IPTG sont ajoutés et la culture est placée à 25°C sous agitation pendant 6 à 16 heures. Les bactéries sont alors centrifugées à 7000  $g$  pendant 20 minutes à 4°C et, si la préparation de membranes est réalisée ultérieurement, le culot bactérien est congelé dans l'azote liquide et gardé à -80°C.

Le culot d'un litre de culture est décongelé, le cas échéant, dans un bain marie à température ambiante, les étapes suivantes sont effectuées dans la glace et avec des solutions refroidies. Le culot est repris à l'aide d'un piston en téflon (sans striures, broyeur type Potter-Elvehjem 30 ml) dans 75 ml de tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 5.8  $\mu$ M leupeptine, 5.8  $\mu$ M pepstatine, 1 mM PMSF). A la fin de la reprise du culot, 1 mM PMSF est à nouveau ajouté. Les cellules sont lysées par trois passages à une pression de 18000 psi dans une cellule de Presse de French de 35 ml (*Thermo IEC*), en laissant refroidir le lysat dans la glace entre chaque passage. Une forte pression dans cette étape de lyse est importante pour assurer que les fragments de membranes produits lors de la lyse des cellules se referment majoritairement dans l'orientation inversée (*inside-out*).

Le lysat ainsi obtenu est centrifugé à 15000  $g$  pendant 30 minutes à 4°C, après avoir ajouté 10 mM EDTA pH 8. Le culot résultant contient les cellules mal lysées et les protéines insolubles, et les vésicules de membranes ainsi que les protéines solubles se retrouvent dans le surnageant. Après un nouvel ajout de 1 mM PMSF, le surnageant est soumis à une

centrifugation à 100000  $xg$  pendant 1 heure à 4°C (40000 rpm rotor 45 Ti ou 35000 rpm rotor 70 Ti), afin de sédimenter les vésicules membranaires. Ce culot est repris dans 10 ml de tampon A' (50 mM Tris-HCl pH 8, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 5  $\mu$ M leupeptine, 5  $\mu$ M pepstatine, 1 mM PMSF) à l'aide d'un broyeur de type Potter-Elvehjem 5 ml. La suspension est diluée jusqu'à 24 ml et soumise à une deuxième étape de centrifugation identique à la précédente. Ce culot final est repris dans 5 ml de tampon B (20 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM saccharose, 1 mM EDTA) à l'aide d'un broyeur de type Potter-Elvehjem 5 ml, et la suspension de membranes ainsi obtenue est aliquotée, congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C.

Le rendement obtenu est typiquement de 100-200 mg de protéines membranaires, les préparations ont des concentrations protéiques entre 20 et 30 mg/ml, déterminées par la méthode de Lowry comme détaillé dans la section « Dosage des protéines ».

### Purification de Yhel/YheH

La purification de Yhel/YheH est faite par chromatographie d'affinité sur une résine de nickel-agarose grâce aux deux étiquettes hexahistidine portées par le transporteur : une étiquette His<sub>6</sub> N-terminale sur Yhel et une étiquette His<sub>6</sub> C-terminale sur YheH.

Les vésicules de membranes sont solubilisées dans la glace et sous agitation douce à une concentration protéique de 1 mg/ml dans le tampon S (50 mM Tris-HCl pH 8, 15% glycérol, 100 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 5  $\mu$ M leupeptine, 5  $\mu$ M pepstatine et 1 mM PMSF). Une solution de n-dodecyl- $\beta$ -maltoside (DDM, *Alexis*) à 10% (w/v) est préparée dans l'eau idéalement de façon extemporanée et ajoutée goutte à goutte à la suspension de membranes jusqu'à une concentration finale de 1% (w/v). Après 3 heures d'incubation, 1 mM PMSF est rajouté et la suspension est centrifugée à 180000  $xg$  pendant 1 heure à 4°C (50000 rpm rotor 70 Ti). Le surnageant, qui contient les protéines solubilisées, est incubé avec la résine Ni-IDA (*Prochem*) à un rapport de 16 ml de surnageant par ml de résine. La résine est équilibrée préalablement avec du tampon S plus 0.05% (w/v) DDM. Après incubation pendant 1h30 à 4°C en agitant le tube sur une roue, le mélange est versé dans une colonne chromatographique Econo-Pac (*Biorad*). La résine est ensuite lavée pendant 18 heures avec 25 volumes de tampon L (tampon S avec 0.05% (w/v) DDM et 20 mM imidazole). L'élution est faite avec 4 volumes de tampon E (tampon S avec 0.05% (w/v) DDM et 250 mM imidazole) et collectée par fractions de 1.5 ml.

La présence de protéine dans l'éluat est vérifiée en ajoutant 1  $\mu$ l de chaque fraction à 5  $\mu$ l de réactif de Bradford (*Coomassie Plus*, *Pierce*) et en examinant le changement de couleur vers le bleu (cf. la description du principe dans la section « Dosage de Bradford »). Les fractions contenant la protéine (typiquement fractions 2 à 4) sont rassemblées dans un boudin de dialyse avec un seuil de coupure de 8000 Da (Spectra/Por 1, *Spectrum Laboratories*) et mises à dialyser à 4°C dans le tampon D (50 mM Tris-HCl pH 8, 10% (v/v) glycérol, 50 mM NaCl, 0.05% (w/v) DDM, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol) comme suit : 2 fois 4 heures dans 500 ml et

16 heures dans 1 litre de tampon D. Les protéines sont finalement aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à -80°C.

La concentration des protéines purifiées est déterminée par la méthode de Bradford comme détaillée dans la section suivante. Le rendement obtenu varie entre 4 et 10% des protéines membranaires totales mises à solubiliser, correspondant à 4-20 mg de protéines par litre de culture bactérienne.

### **Concentration des protéines**

Si besoin, les protéines purifiées sont concentrées par centrifugation à travers une membrane d'ultrafiltration en polyethersulfone avec un seuil de coupure de 100 kDa (*Vivaspin*, *Sartorius*), en suivant les indications du fournisseur. La taille de la micelle de DDM a été estimée à 70 kDa (VanAken *et al.* 1986) et plus précisément à  $72 \pm 1.4$  kDa (Strop *et al.* 2005), ce qui suggère qu'une membrane avec un seuil de 100 kDa ne devrait pas concentrer les micelles de détergent. En effet, une étude réalisée avec des dispositifs d'ultrafiltration Centricon (*Amicon*) montre que le détergent n'est pas retenu sur des membranes de 100 kDa, alors qu'il est concentré plus de 30 fois sur une membrane de 50 kDa (lors d'une concentration du volume de départ de 80 fois ; Urbani *et al.* 2005). En revanche, lors d'une concentration plus douce (10x), Maslennikov *et al.* (2007) trouvent que le dispositif Vivaspin même avec un seuil de 50 kDa ne retient pas le DDM.

### ***Dosage des protéines***

Deux méthodes de dosage protéique ont été utilisées : (i) la méthode modifiée de Lowry pour déterminer la concentration protéique des vésicules de membrane et (ii) la méthode de Bradford pour doser les protéines purifiées en présence de détergent.

#### **Méthode modifiée de Lowry**

La méthode développée par Lowry permet le dosage de 5 à 100 µg de protéines (Lowry *et al.* 1951) par une réaction en deux temps. Un complexe cupro-protéique est d'abord formé entre la protéine (surtout les résidus tyrosine et tryptophane, ainsi que cystéine et histidine à un degré moindre) et du sulfate-tartrate cuprique en milieu alcalin. En présence de ce complexe, le réactif Folin-Ciocalteu (mélange de phosphomolybdate et phosphotungstate) est réduit et développe une coloration bleue, montrant un maximum d'absorbance à 750 nm. Cette coloration est linéaire entre 1 et 1500 µg/ml (pour l'albumine de sérum bovin ou BSA).

Le dosage des vésicules de membranes est effectué en utilisant le kit *Modified Lowry Protein Assay* (Pierce), qui est basé sur cette méthode mais utilise un réactif sulfate-tartrate cuprique (réactif de Lowry) modifié pour augmenter sa stabilité. Pour le dosage, les vésicules de membrane (dans du tampon B) sont diluées au 1/50 et 1/100 (dans l'eau et eau/tampon B,

respectivement) en triple. Une gamme étalon de BSA (*Sigma*) est préparée parallèlement en double dans le même tampon (eau/tampon B) allant de 0 à 180 µg (0-1.5 mg/ml). 120 µl d'échantillon protéique sont incubés à température ambiante avec 600 µl du réactif de Lowry modifié pendant exactement 10 minutes. 60 µl du réactif Folin-Ciocalteu 1 N (réactif 2 N dilué deux fois avec de l'eau juste avant le dosage) sont ajoutés et l'échantillon est immédiatement agité. Après 30 minutes de développement de la coloration, l'absorbance des échantillons est mesurée. Pour des raisons pratiques (disponibilité du filtre), la DO est mesurée à 595 nm; à cette longueur d'onde, l'absorbance du mélange correspond environ à 80% de celle observée à son maximum d'absorption (Lowry *et al.* 1951).

Pour éviter des interférences par différents composés, plusieurs modifications de la méthode de Lowry ont été proposées, dont la précipitation préalable des protéines avec l'acide trichloroacétique ou TCA (Bensadoun *et al.* 1976) ou au TCA combiné avec le deoxycholate ou DOC (Peterson 1977). Pour la précipitation au TCA/DOC, 120 µl de vésicules de membranes sont mélangés avec 60 µl de DOC 2% (w/v) et 600 µl de TCA 10% (v/v), et soumis à une centrifugation de 10 minutes à 15000 *xg*. Le culot est repris par 120 µl de NaOH 0.2 N avant d'effectuer le dosage comme décrit ci-dessus. Les deux méthodes (avec ou sans précipitation) se sont avérées comparables pour mesurer la concentration de nos échantillons membranaires.

### Dosage de Bradford

La méthode développée par Bradford (1976) est basée sur le changement du spectre d'absorption du colorant bleu de Coomassie G250 suite à sa fixation sur des protéines en milieu acide, passant d'une forme brune/rougeâtre (maximum d'absorbance à 465 nm) à une forme bleue (maximum d'absorbance à 610 nm). La différence maximale entre les intensités d'absorbance de ces deux formes se produit à 595 nm. La coloration est linéaire dans un intervalle plus étroit que celui de la méthode de Lowry (125-1000 µg/ml) et présente une variabilité plus importante en fonction de la protéine dosée. Malgré ces inconvénients, il s'agit d'une technique très utile parce qu'un seul réactif est nécessaire et que le développement de la coloration s'achève au bout de 2 minutes.

Concernant les interférences par des détergents, l'étude de Bradford (1976) montre que des concentrations de 0.1% SDS ou Triton X-100 donnent lieu à une erreur équivalente à 10 µg/ml. Cette méthode semble ainsi appropriée pour doser les protéines purifiées, étant donné que la concentration en DDM des échantillons dosés dans ce travail est 4 fois plus faible (0.025% w/v).

Afin de déterminer leur concentration protéique par cette méthode, les protéines (dans du tampon D) sont diluées au 1/2 et 1/5 (dans l'eau et eau/tampon D, respectivement) en triple. Une gamme étalon de 0-30 µg (0-1 mg/ml) BSA (*Sigma*) est préparée parallèlement en double dans le même tampon (eau/tampon D). 30 µl d'échantillon protéique sont mélangés avec 900 µl de réactif *Coomassie Plus* (*Pierce*). Après 10 minutes, l'absorbance des échantillons est mesurée à 595 nm.

## Détection des protéines

### Electrophorèse des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Sauf indiqué autrement, l'échantillon protéique à analyser est mélangé avec 1/3 de volume de tampon Laemmli 4x (TL4x : 250 mM Tris-HCl pH 6.8, 40% (v/v) glycérol, 8% (w/v) SDS, 4% (v/v)  $\beta$ -mercaptoéthanol et 0.001-0.04% (w/v) bleu de bromophénol). Avant de les déposer sur gel, les échantillons sont chauffés à 95°C (pour des protéines solubles) ou à 37°C (pour des protéines membranaires) pendant 5 à 10 minutes. Dans cette étape, le détergent SDS (à une concentration finale de 2%) dénature les protéines et se lie de façon proportionnelle à la taille de protéine (1.4 g de SDS/g de protéine ; Reynolds *et al.* 1970), de telle sorte que la densité de charge (q/m) devient identique pour toutes les protéines. Quand déposées sur gel de polyacrylamide et soumises à un champ électrique, leur mobilité électrophorétique étant identique, les protéines sont séparées en fonction de leur taille par le tamis moléculaire que représente le gel de polyacrylamide. Cependant, plusieurs exceptions à ce comportement idéal sont connues. Par exemple, les protéines intégrales de membrane migrent généralement 10-20% plus vite que ce qui est prédit à partir de leur poids moléculaire (Newstead *et al.* 2007), ce qui pourrait résulter d'une liaison augmentée de SDS de par leur caractère hydrophobe (Rais *et al.* 2004).

Pour la formation des gels, la polymérisation d'une solution d'acrylamide est induite par du persulfate en présence de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), cette amine tertiaire catalysant la formation de radicaux libres du persulfate qui déclenchent la polymérisation de l'acrylamide. La solution contient un mélange d'acrylamide et bisacrylamide, le rapport entre ces deux monomères contrôlant le degré de réticulation du gel. Le rapport acrylamide:bisacrylamide utilisé dans ce travail est de 37.5:1. Le gel de concentration (*stacking*) contient 100 mM Tris-HCl pH 6.5, 4% (w/v) acrylamide, 0.1% (w/v) SDS, 0.1% (w/v) persulfate d'ammonium (APS) et 0.001% (v/v) TEMED, qui est ajouté en dernier. La concentration d'acrylamide du gel de séparation est choisie en fonction des protéines à étudier. A titre indicatif, des gels à 12% ont été utilisés pour les protéines de l'ordre de 30 kDa, et une concentration d'acrylamide de 9-10% a été choisie pour visualiser des protéines à partir de 60 kDa. Mis à part la concentration d'acrylamide et le tampon (375 mM Tris-HCl pH 8.5), la composition du gel de séparation est identique à celle du gel concentrateur.

Le système *Mini-Protean* de *Bio-Rad* a été utilisé pour la préparation des gels (8.3 x 7.3 cm, 10 ou 15 puits) et l'électrophorèse. La migration s'effectue sous courant constant (20-25 mA/gel) dans un tampon contenant 25 mM Tris, 192 mM glycine et 0.1% (w/v) SDS.

Pour la visualisation des bandes protéiques, le gel est ensuite lavé brièvement à l'eau et coloré pendant ~30 minutes dans la solution de coloration (0.25% (w/v) bleu de Coomassie R250, 10% (v/v) acide acétique et 40% (v/v) éthanol). La décoloration se fait dans une solution composée d'acide acétique 10% (v/v) et d'éthanol 25% (v/v). Les gels sont gardés dans l'eau et

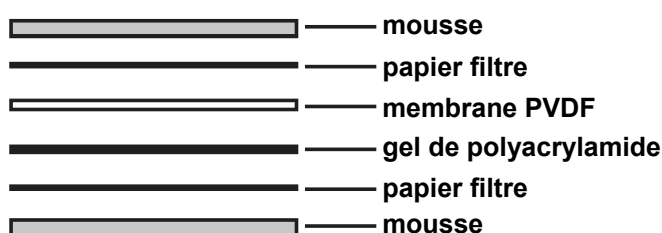


séchés entre deux feuilles de cellophane (*GelAir Drying System*, *Bio-Rad*) pour un stockage à long terme.

### Détection de protéines portant des étiquettes polyhistidine

Après migration, les protéines sont transférées du gel de polyacrylamide à une membrane de PVDF (fluorure de polyvinylidène) par électrophorèse dans un système liquide (*Mini-Protean*, *Bio-Rad*) : la membrane de PVDF (*Immobilon-P* ou *P<sup>SQ</sup>*, *Millipore*) est mise en contact avec le gel de polyacrylamide, ce sandwich est plongé dans du tampon de transfert et soumis à un champ électrique (gel vers la cathode et membrane vers l'anode) qui induit le transfert des protéines vers la membrane. La composition du tampon de transfert (tampon T) est 25 mM Tris, 192 mM glycine et 10% (v/v) méthanol, auquel 0,005% (w/v) SDS est ajouté pour favoriser le transfert de protéines de haut poids moléculaire.

La membrane de PVDF, coupée à la taille du gel, est incubée 15 secondes dans du méthanol, puis 2 minutes dans l'eau. Elle est ensuite équilibrée dans le tampon T pendant au moins 5 minutes. Le gel de polyacrylamide est lavé brièvement à l'eau juste après migration et équilibré dans le tampon T pendant 15 minutes. Des feuilles épaisses de papier filtre et de mousse sont également trempées dans le tampon T. Le sandwich est ensuite assemblé selon le schéma ci-dessous et placé dans la cuve d'électrophorèse avec le gel orienté vers la cathode.



Le transfert se fait dans la glace à 250 mA pendant 1-2 heures (d'autant plus longtemps que la taille des protéines à transférer est importante). A la fin du transfert, la membrane est laissée sécher à l'air pendant 16 heures ou dans une étuve à 37°C pendant 1 heure, avant de poursuivre le protocole.

La détection de protéines contenant des étiquettes polyhistidine est effectuée grâce à une version de l'enzyme peroxydase (isolée de la racine de raifort) modifiée avec un groupe chélateur de nickel (e.g.  $\alpha$ -N'-bis-carboxyméthyllysine). Sous sa forme chargée en nickel, cette protéine se lie aux étiquettes polyhistidine (Jin *et al.* 1995), qui peuvent ensuite être repérées grâce à une réaction chimiluminescente : Quand la membrane est incubée avec du luminol (ou un dérivé) et du peroxyde d'hydrogène, la décomposition de celui-ci par la peroxydase induit l'oxydation du luminol, qui résulte en l'émission de lumière.

La peroxydase modifiée (*HisProbe-HRP*) et le substrat chimiluminescent (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*) sont achetés chez *Pierce*. La détection des protéines étiquetées est réalisée selon les indications du fournisseur.

## Chromatographie d'exclusion de taille

Afin de vérifier l'état des protéines purifiées, des analyses chromatographiques ont été effectuées à l'aide d'une colonne Superdex 200 10/300 GL (*Amersham*) sur un appareil Äkta Purifier 10 (*GE Healthcare*). La matrice Superdex est composée de billes (13  $\mu\text{m}$  de diamètre moyen) constituées d'un mélange d'agarose réticulée et de dextran. La colonne Superdex 200 permet la séparation de protéines globulaires entre 10 et 600 kDa. La calibration préalable de la colonne avec des protéines de rayon hydrodynamique (ou rayon de Stokes  $R_s$ ) connu permet d'estimer ensuite la valeur de  $R_s$  (et donc la masse moléculaire  $M_w$ ) pour une protéine à partir de son volume d'élution. Grâce à cette méthode, qui est réalisée en conditions natives, il est possible d'évaluer l'homogénéité d'une protéine à l'issue d'une purification, ainsi que son état d'agrégation.

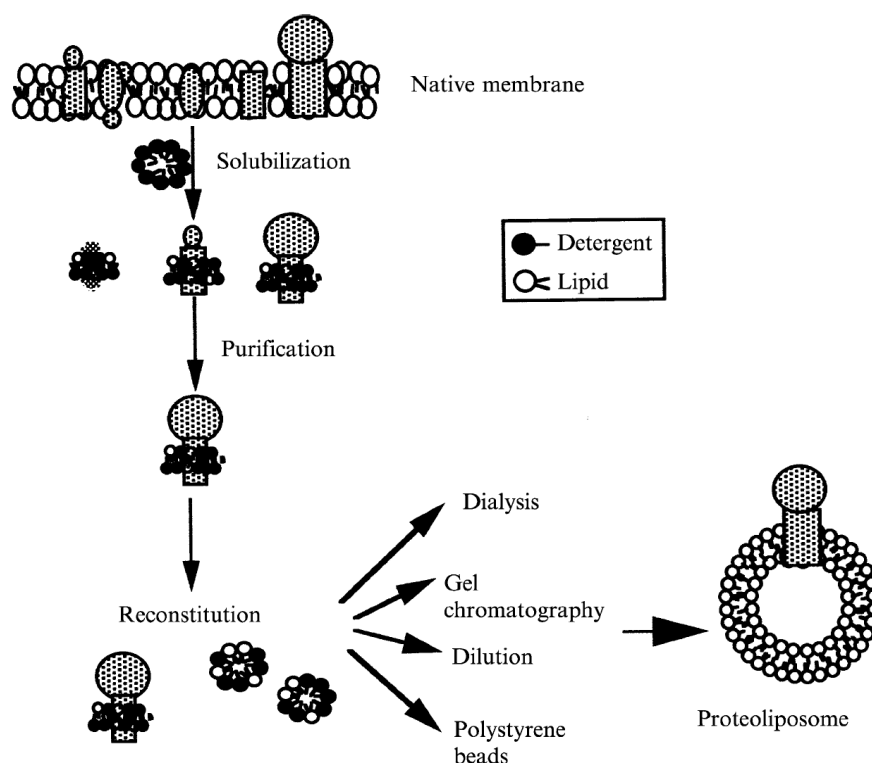
En sortie de purification, les protéines membranaires se trouvent dans un complexe protéine/(lipide)/détergent (des lipides de la membrane peuvent copurifier avec la protéine), de telle sorte que la taille de ce complexe dépend non seulement de la masse moléculaire de la protéine, mais également des contributions du détergent et du lipide liés. Les profils de chromatographie d'exclusion de taille de ces complexes ne permettent pas de remonter avec précision jusqu'à la taille correcte du complexe, puisque des interactions électrostatiques entre le détergent et la matrice de la colonne faussent le résultat de la chromatographie et en diminuent la capacité résolutive. Cependant, cette technique reste un outil puissant pour l'évaluation qualitative de l'état d'agrégation d'une protéine membranaire, ainsi que pour une estimation approximative de la taille du complexe protéine/lipide/détergent.

La chromatographie est réalisée, sauf indiqué autrement, dans du tampon F (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glycérol, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 0.05% (w/v) DDM) et à un débit de 0.3-0.4 ml/min. Après une centrifugation à 15000  $xg$  pendant 10 minutes à 4°C pour sédimenter de possibles agrégats, 500  $\mu\text{l}$  de protéine à une concentration minimale de 0.15 mg/ml sont injectées dans la colonne. L'élution est visualisée en suivant l'absorbance à 280 nm et des fractions de 500  $\mu\text{l}$  sont collectées qui seront analysées sur gel SDS-PAGE.

La calibration de la colonne est réalisée dans les mêmes conditions de tampon et débit, en injectant les protéines suivantes (*High et Low Molecular Weight Gel Filtration Kit ; Amersham*) préparées à 5 mg/ml dans le tampon F (sauf la ferritine, à 1 mg/ml): ferritine ( $M_w$  440 kDa,  $R_s$  61.0 Å), aldolase ( $M_w$  158 kDa,  $R_s$  48.1 Å), ovalbumine ( $M_w$  43 kDa,  $R_s$  30.5 Å), ribonucléase A ( $M_w$  13.7 kDa,  $R_s$  16.4 Å). Il a été montré que le rayon de Stokes de ces protéines n'est pas modifié en présence de DDM (le Maire *et al.* 1986). Le volume mort  $V_0$  de la colonne est déterminé en injectant du bleu dextran 2000 (*Molecular Weight Gel Filtration Kit ; Amersham*) préparé à 1 mg/ml dans le tampon F. A partir du volume mort  $V_0$ , du volume total de la colonne  $V_t$  et du volume d'élution  $V_e$  de chacune des protéines utilisées pour la calibration, une droite est interpolée  $V_e/V_0$  ou  $(V_e - V_0)/(V_t - V_0)$  vs.  $\log M_w$  ou  $\log R_s$ , donnant essentiellement la même qualité de fit ( $R^2 > 0.98$ ).

## Reconstitution des protéines en liposomes

Après son extraction de la membrane et sa purification, l'étude d'une protéine membranaire nécessite souvent une étape de reconstitution en liposomes. La préparation de protéoliposomes à partir de protéines en détergent peut être réalisée par différentes techniques, comme illustrée dans la figure ci-dessous (Rigaud *et al.* 2003). Nous avons choisi de suivre le protocole mis au point par J.L. Rigaud et D. Lévy (Rigaud *et al.* 1995; Rigaud *et al.* 2003), où l'incubation avec des billes en polystyrène (commercialisées par *Bio-Rad* sous le nom de *Bio-Beads*) permet d'éliminer le détergent d'un mélange protéine/détergent/lipide avec formation concomitante de protéoliposomes. Ces billes poreuses et hydrophobes montrent une forte sélectivité pour le détergent : leur capacité d'adsorption est chiffrée e.g. à 105 mg de DDM ou à 185 mg de Triton X-100 par g de Bio-Beads, alors qu'elles adsorbent au maximum 4 mg de phospholipides et 0.2 mg de protéine par gramme (Rigaud *et al.* 1998).



La reconstitution se fait en trois étapes: (i) solubilisation des lipides avec du détergent, (ii) incubation de la protéine purifiée avec le mélange lipide/détergent et (iii) élimination du détergent avec les Bio-Beads. Plusieurs paramètres peuvent être variés dans ce protocole pour optimiser la reconstitution et l'adapter à la protéine d'intérêt. Dans ce travail, plusieurs aspects ont été étudiés en vue d'une optimisation de la reconstitution: (a) le choix des lipides, (b) du détergent et (c) le rapport lipide:protéine utilisé. Le protocole général employé a été le suivant :

- I. **Solubilisation des lipides.** Les lipides utilisés majoritairement lors de ce travail étaient (i) un extrait total d'*E. coli* ou (ii) phosphatidylcholine d'œuf/acide phosphatidique dans un rapport 9:1 (mol/mol) (tous achetés en chloroforme chez *Avanti Polar Lipids*). Le volume souhaité de lipides pour une concentration finale de 4 mg/ml (~5 mM) est déposé dans un tube Corex sous azote et un film lipidique est créé par évaporation du chloroforme sous azote. Le film lipidique dans le tube est mis sous vide pendant 1h30 pour compléter l'évaporation du solvant et ensuite incubé avec le tampon de solubilisation pendant 3-16 heures à température ambiante sous agitation magnétique douce. La composition de ce tampon est 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM KCl, 25 mM NaCl, 4% (v/v) glycérol, 1 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol et du détergent à des rapports détergent:lipide de 2.5-3.5 (w/w) (rapport adapté selon le détergent pour obtenir une solution limpide, i.e. une solubilisation totale des lipides). Différents détergents ont été étudiés : décyl- et dodécyl- $\beta$ -maltoside, Triton X-100 et octylthiogluco-side.
- II. **Incubation de la protéine avec le mélange lipide/détergent.** Le rapport lipide:protéine utilisé a été choisi entre 15 et 100 (w/w). Plus ce ratio est bas, plus la concentration de protéine par liposome est importante, mais un rapport trop bas lipide:protéine ne peut être sélectionné si l'on a besoin de protéoliposomes étanches, notamment pour des mesures de transport. L'incubation se fait à température ambiante pendant 15 minutes dans un tube eppendorf, sous agitation avec un petit barreau aimanté. Si le volume final est supérieur à 200  $\mu$ l, le tube n'est pas mis sous agitation, mais en rotation sur une roue.
- III. **a) Préparation des Bio-Beads** (SM2 adsorbent, 20-50 mesh ; *Bio-Rad*). 1-2 g de Bio-Beads sont incubés dans 15 ml de méthanol pendant 30 minutes sous agitation douce. Après aspiration du méthanol, elles sont lavées 3-fois dans 20 ml d'eau pendant 5 minutes, toujours sous agitation douce. Les Bio-Beads sont ensuite conservées à 4°C dans l'eau pendant 1 mois (au-delà elles doivent être relavées).
- b) Elimination du détergent.** La vitesse d'élimination du détergent par des Bio-Beads peut être contrôlée par la quantité de billes ajoutées ainsi que par la température et le temps d'incubation. La vitesse d'élimination du détergent du mélange lipide/protéine/détergent a notamment des conséquences sur les interactions protéine-protéine et protéine-lipide, de même que sur la taille des protéoliposomes formés, l'élimination rapide aboutissant à des liposomes de petite taille (Levy *et al.* 1990). D'autre part, il a été montré que la solubilisation de lipides avec du DDM peut résulter dans une phase gel qui mène, si l'élimination du détergent se fait lentement, à la formation de protéoliposomes multilamellaires (Lambert *et al.* 1998). Dans ce travail, un rapport BioBeads:détergent de 20 (w/w) a été choisi. Trois ajouts de cette quantité de Bio-Beads (rapport final 60 w/w) sont réalisés avec une première incubation de 2 heures suivie de deux incubations d'une heure chacune, toujours à température ambiante.

Le surnageant contenant les protéoliposomes (à une concentration protéique finale de 0.09 mg/ml) est conservé dans la glace ou à 4°C et les mesures d'activité sont réalisées au plus tard 48 heures après.

Des études de reconstitution de la bactériorhodopsine (Rigaud *et al.* 1988; Lambert *et al.* 1998) et de la  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPase du réticulum sarcoplasmique (Levy *et al.* 1992), entre autres, ont montré qu'il est possible d'incorporer ces protéines directement dans des liposomes saturés en octylglucoside ou en DDM (i.e. aux rapports détergent:lipide maximaux ne solubilisant pas les liposomes). Cette incorporation directe aurait l'avantage d'induire une orientation unique des protéines dans les protéoliposomes (Rigaud *et al.* 1995). En collaboration avec le groupe de D. Lévy, nous avons étudié l'incorporation de nos protéines dans des liposomes à différents stades de solubilisation par le décylmaltoside. Les liposomes, préparés à partir d'un mélange de phosphatidylcholine et d'acide phosphatidique (9:1 mol/mol) par la méthode d'évaporation en phase inverse (Rigaud *et al.* 2003), ont été solubilisés à des ratios entre 0.5 et 2.5 mol/mol (détergent:lipide). La turbidité des liposomes aux différents stades de solubilisation a été quantifiée en mesurant la  $\text{DO}_{450\text{nm}}$ , et leur morphologie a été observée par cryomicroscopie électronique. La reconstitution a été réalisée comme indiqué ci-dessus, sauf qu'une même quantité de Bio-Beads a été ajoutée à tous les échantillons, notamment celle correspondant à un rapport Bio-Beads:détergent de 40 (w/w) prenant comme référence l'échantillon le plus concentré en détergent (celui avec un ratio détergent:lipide 2.5 mol/mol).

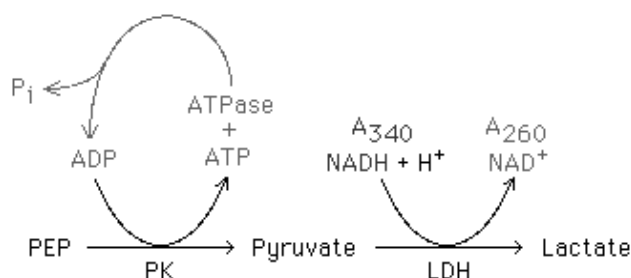
## Mesures d'activité ATPase

## Préparation des solutions concentrées d'ATP et d'orthovanadate

L'ATP (*Sigma*) est préparé à 100 mM dans 100 mM Hepes KOH pH 8, et le pH final ajusté à 7-8 avec du KOH. Ce stock est aliquoté et gardé à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Pour la préparation d'une solution de 100 mM orthovanadate, 100 mg de  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  sont pesés, et 3 ml d'eau sont ajoutés. La solution est chauffée à  $90^{\circ}\text{C}$  pour dissoudre le vanadate. De l'acide chlorhydrique 6N est ajouté pour ajuster le pH à 10. La solution est chauffée à nouveau jusqu'à ce que la solution redevienne incolore. Les étapes de réajustement du pH et de chauffage sont répétées jusqu'à ce que la solution reste incolore. La solution est complétée à 5 ml, puis la concentration exacte en vanadate est mesurée spectrophotométriquement à 265 nm ( $\epsilon = 2925 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La solution est aliquotée et gardée à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Avant chaque utilisation, cette solution stock est incubée à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes pour scinder les formes polymériques du vanadate.

## Dosage de l'ADP produit par la réaction

L'ADP formé par l'hydrolyse du phosphate  $\gamma$  de l'ATP peut être dosé à l'aide d'un système pluri-enzymatique couplé (Pullman *et al.* 1960). Ce système faisant intervenir, comme schématisé dans la figure ci-dessous, la pyruvate kinase (PK) et la lactate déhydrogénase (LDH), permet de régénérer continuellement l'ATP grâce au phosphoénolpyruvate (PEP) et aboutit à l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$ . La disparition du NADH peut être suivie au spectrophotomètre à 340 nm. A une mole d'ATP hydrolysée correspond une mole de NADH oxydée.



Cette technique permet ainsi de mesurer une activité d'hydrolyse de l'ATP en temps réel, mais son application est limitée par les possibles interactions de l'échantillon avec le système enzymatique PK/LDH. On peut citer par exemple la présence d'enzymes avec une activité NADH oxydase dans l'échantillon à doser (e.g. dans les vésicules de membrane isolées d'*E. coli*). Un autre cas pertinent est l'oxydation du NADH que le vanadate est capable d'induire par la formation d'anions superoxyde (Vyskocil *et al.* 1980 ; Ramasarma *et al.* 1981). Cependant, cette oxydation de NADH induite par le vanadate serait uniquement observée dans du tampon phosphate, et non détectable dans des tampons Tris ou Hepes (Vijaya *et al.* 1984).

La sensibilité de cette méthode est limitée principalement par les fluctuations du spectrophotomètre et par la décomposition du NADH induite par l'irradiation aux UV. Celle-ci peut être diminuée en augmentant l'intervalle entre deux mesures et en diminuant la concentration de NADH. Afin d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit -objectif particulièrement important lors de l'étude de protéines à faible activité ATPase-, la quantité de protéine utilisée peut être augmentée et, si la protéine est suffisamment stable, la mesure peut être prolongée. Des activités d'hydrolyse aussi faibles que 0.2  $\mu\text{M}/\text{min}$  ont pu être détectées par cette méthode (Procko *et al.* 2008).

Pour mesurer l'activité des protéines en détergent, le tampon utilisé est 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% (v/v) glycérol, 5 mM  $\beta$ -mercaptoéthanol, 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LDH (isolé de muscle de lapin ou de porc, *Roche*), 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PK (isolé de muscle de lapin, *Roche*), 4 mM PEP (*Roche*), 0.4 mM NADH (*Roche*) et 0.05% (w/v) DDM (*Alexis*), sauf précisé autrement. Les mesures d'activité des protéoliposomes sont effectuées dans 50 mM Hepes KOH pH 8, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LDH, 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PK, 4 mM PEP et 0.4 mM NADH, en absence de détergent. Le cas échéant, des inhibiteurs/activateurs (typiquement de l'orthovanadate à 0.2-0.5 mM) sont également ajoutés au temps zéro. Dans une cuve en quartz avec une épaisseur de 1 cm et un volume de 500  $\mu\text{l}$ , 10-20  $\mu\text{g}$  de protéine en détergent ou 2-4  $\mu\text{g}$  de protéoliposomes sont incubés dans le tampon à 30 ou 37°C pendant 5 minutes. La réaction est déclenchée par ajout de l'ATP (typiquement 20  $\mu\text{l}$  d'ATP à 100 mM pour une concentration finale de 4 mM) et l'absorbance à 340 nm est suivie pendant 10 minutes. La pente ( $\Delta\text{DO}_{340\text{nm}}/\Delta t$ ) est calculée en écartant les 2 ou 4 premières minutes, car elles montrent souvent une faible linéarité, due à un mélange imparfait, au signal provenant de l'ADP présent dans la solution d'ATP et/ou à une température non stable. La vitesse de la réaction d'hydrolyse d'ATP est déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire du NADH ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) selon la loi de Beer-Lambert (où  $l$  et  $V$  représentent l'épaisseur de la cuve et le volume réactionnel, respectivement):

$$\frac{\Delta n_{\text{ATP}}}{\Delta t} = \frac{\Delta[\text{ATP}]}{\Delta t} \times V = \frac{\Delta[\text{NADH}]}{\Delta t} \times V = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} \times V}{\Delta t \times l \times 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}} = \frac{\Delta\text{DO}_{340\text{nm}} \times 500 \mu\text{l}}{\Delta t \times 6220 \text{ M}^{-1}}$$

### Dosage du phosphate inorganique produit par la réaction

Le phosphate inorganique (Pi) libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP peut être dosé par des méthodes colorimétriques basées sur la formation en milieu acide d'un complexe entre du phosphomolybdate et un colorant basique, le spectre d'absorption du colorant étant modifié par la liaison avec le phosphomolybdate. La méthode utilisée ici, développée par Van Veldhoven *et* Mannaerts (1987), fait intervenir le vert malachite comme colorant et un polymère (polyvinylalcool ou PVA) pour stabiliser le complexe colorant-phosphomolybdate. Cette méthode présente une réponse linéaire entre 1 et 20  $\mu\text{M}$  Pi et permet de s'affranchir des interactions qui peuvent se produire entre des composés présents dans l'échantillon et le système enzymatique utilisé pour le dosage d'ADP. Le désavantage majeur de cette technique par rapport au dosage d'ADP est l'impossibilité de la détection en temps réel.

La réaction est réalisée en présence du système PEP/PK de régénération d'ATP et de l'azoture pour inhiber la  $F_0-F_1$ -ATPase présente dans les fractions membranaires. Un volume de 50  $\mu$ l contenant 50 mM Hepes KOH pH 8, 7 mM  $MgCl_2$ , 7 mM ATP, 2 mM  $NaN_3$ , 4 mM PEP, 60  $\mu$ g/ml pyruvate kinase, 25  $\mu$ g de protéines de membrane et, le cas échéant, de l'orthovanadate à 0.2-0.5 mM est placé à 37°C. Des prélèvements de 4  $\mu$ l sont faits à différents temps et mélangés avec 200  $\mu$ l de  $H_2SO_4$  25 mM pour arrêter la réaction, dans une plaque de 96 puits qui est gardée à température ambiante. Une gamme étalon de  $P_i$  est réalisée dans les mêmes conditions, ainsi qu'un contrôle de dégradation d'ATP en absence de protéine. La réaction de révélation se fait en même temps pour tous les puits de la plaque : 30  $\mu$ l de réactif A sont ajoutés par puits et incubés pendant 10 minutes à température ambiante en agitant la plaque. 30  $\mu$ l de réactif B sont ensuite ajoutés par puits et incubés également sous agitation pendant 30 minutes avant de lire l'absorbance de la plaque à 650 nm.

**Réactif A:** à 412.5 ml d'eau sont ajoutés 87.5 ml d' $H_2SO_4$  concentré (18 M) et 8.75 g de molybdate d'ammonium  $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$  (*Sigma*), et le tout est mélangé jusqu'à dissolution complète. Ce réactif est stocké à température ambiante.

**Réactif B:** dans 450 ml d'eau, 1.75 g de polyvinyl alcool ( $M_w$  30 000-70 000, *Sigma*) est ajouté et la solution est chauffée à 80°C sous agitation jusqu'à dissolution complète. Après refroidissement, 0.175 g de vert malachite (*Sigma*) sont ajoutés. Après homogénéisation, la solution est complétée à 500 ml et stockée à température ambiante, à l'abri de la lumière.

### *Mesures de transport de drogues*

Pour étudier le transport de drogues, au sein des vésicules de membrane ou dans des bactéries, des mesures de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un spectrofluorimètre QuantaMaster™ UV VIS (*Photon Technology International*), qui est équipé d'une lampe à Xénon de 75 Watts délivrant une lumière continue entre 240 et 1200 nm. L'échantillon est placé dans une cuve en quartz SUPRASIL (*Hellma*) de 1 cm x 1 cm et 1.5 ml de volume maximal, avec une cavité circulaire pour loger un barreau magnétique. Le porte-cuve est muni d'un régulateur de température à circulation d'eau, qui permet de maintenir l'échantillon à température constante, ainsi que d'un dispositif d'agitation, permettant d'homogénéiser en permanence le milieu réactionnel. L'ouverture des fentes est réglée à 1-2 nm pour l'excitation et 2-4 nm pour l'émission, et le gain fixé de façon à ce que le signal de référence atteigne ~1 V.

Le tableau de la page suivante récapitule les fluorophores qui ont été employés dans cette étude et détaille les conditions de mesure utilisées. Ces composés ont été décrits dans la littérature comme substrats de nombreux transporteurs ABC MDR (cf. tableau 4 à titre indicatif).



	fournisseur	concentration ( $\mu\text{M}$ )	$\lambda_{\text{excitation}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)
BCECF <sup>16</sup>	<i>Biochemika</i>	12.5	494	521
Bromure d'éthidium	<i>Gibco</i>	10	500	580
Doxorubicine	<i>Sigma</i>	10	480	590
Hoechst 33342 <sup>16</sup>	<i>Sigma</i>	1	355	457
Mitoxantrone	<i>Sigma</i>	5	608	690

### Transport de drogues dans des cellules

Le **bromure d'éthidium** est un colorant polycationique (cf. Annexe C pour sa structure chimique) utilisé couramment pour la détection des acides nucléiques. Il est faiblement fluorescent en milieu aqueux, mais sa fluorescence augmente 30-fois suite à son incorporation dans l'ADN (Lakowicz 1999). L'environnement hydrophobe du complexe ADN/éthidium ralentirait l'échange de protons et prolongerait de ce fait la durée de vie de l'état excité (Olmsted *et al.* 1977). Le fluorophore **Hoechst 33342**, employé intensivement en biologie cellulaire pour la coloration des noyaux (cf. Annexe C pour sa structure chimique), a une augmentation similaire du rendement quantique de fluorescence suite à sa liaison à l'ADN (Cosa *et al.* 2001). Grâce à ces propriétés, il est possible de visualiser par spectrofluorimétrie l'incorporation de ces composés dans des cellules exprimant le transporteur d'intérêt et, en utilisant des cellules exprimant un transporteur inactif comme contrôle, de mettre en évidence une possible activité d'efflux (i.e. une accumulation réduite) catalysée par le transporteur étudié.

Pour réaliser ces expériences, plusieurs colonies d'*E. coli* KAM32 transformées la veille avec les plasmides 18ih ou 18ih K377A/K469A sontensemencées dans du milieu Mueller Hinton avec 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicilline et la culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  atteigne 0.5. Les bactéries sont ensuite centrifugées à 2000  $\times g$  pendant 4 minutes à 4°C et resuspendues à la même DO dans 0.35 M NaCl. 730  $\mu\text{l}$  de la suspension bactérienne sont ajoutés dans la cuve de fluorescence et complétés à un volume final de 1 ml avec 50 mM KPi pH 7.2, 25 mM glucose et 5 mM  $\text{MgSO}_4$  (concentrations finales). La réserpine (utilisée couramment à 10  $\mu\text{M}$ ) peut être ajoutée pour inhiber l'activité des transporteurs de multiples drogues. Après 5 minutes d'incubation à 37°C, le fluorophore est ajouté et l'évolution de la fluorescence est suivie pendant 15 minutes à 37°C.

### Transport de drogues par des vésicules de membrane inversées

Shapiro *et al.* (1995) ont trouvé que la fluorescence du **Hoechst 33342** augmente non seulement suite à l'interaction avec l'ADN, mais également après incorporation dans un milieu lipidique. Cette propriété a permis à ces auteurs de visualiser par spectrofluorimétrie l'activité de transport du Hoechst 33342 des vésicules de membrane obtenues à partir de cellules surexprimant la glycoprotéine-P (Shapiro *et al.* 1997). Quand incubé avec les membranes, le

<sup>16</sup> BCECF : 2',7'-bis-(2-carboxyéthyl)-5-(et-6)-carboxyfluorescéine

Hoechst 33342 : 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-méthyl-1-piperaziny)-2,5'-bi-1H-benzimidazole

fluorophore s'incorpore dans le milieu lipidique de par sa nature hydrophobe, entraînant une forte augmentation de sa fluorescence. Dans les vésicules de membrane inversées, les domaines nucléotidiques du transporteur ABC sont exposés vers l'extérieur et donc en contact avec le milieu réactionnel. Cela permet de déclencher son activité de transport par l'ajout d'ATP dans le tampon de mesure. Ainsi, le transport du Hoechst 33342 incorporé dans la membrane vers le milieu aqueux de l'intérieur de la vésicule induit une diminution de sa fluorescence, qui est détectable en temps réel par spectrofluorimétrie.

Un autre fluorophore dont le transport peut être suivi avec la même méthode est la **doxorubicine**. Il s'agit d'un anticancéreux de la famille des anthracyclines (cf. Annexe A pour sa structure chimique) capable de s'intercaler dans l'ADN et d'inhiber ainsi l'ADN topoisomérase II. Son incorporation dans l'ADN a pour conséquence une forte diminution de sa fluorescence, ce qui permet de suivre en temps réel le transport de la doxorubicine par spectrofluorimétrie si les vésicules/liposomes contiennent de l'ADN à l'intérieur (Guiral *et al.* 1994). Les vésicules de membrane préparées par disruption cellulaire dans la Presse de French enferment en effet de l'ADN chromosomique bactérien, rendant possible l'utilisation de la technique de visualisation décrite pour le Hoechst 33342 (Steinfels *et al.* 2004).

La **mitoxantrone** est une anthracènedione utilisée en chimiothérapie (cf. Annexe A pour sa structure chimique) qui est substrat de ABCG2 et ABCB1 (Litman *et al.* 2001). Ses propriétés fluorescentes s'avèrent comparables à celles de la doxorubicine : l'incorporation de la mitoxantrone dans l'ADN entraîne une diminution de sa fluorescence, permettant le même type de mesure spectrofluorimétrique pour étudier son transport par des vésicules de membrane (Steinfels *et al.* 2004).

Ainsi, les mesures de transport du Hoechst 33342, de la doxorubicine et de la mitoxantrone par des vésicules de membranes surexprimant la protéine d'intérêt ont été réalisées dans 50 mM Hepes KOH pH 8, 2 mM  $MgCl_2$ , 8.5 mM NaCl, 40  $\mu$ g pyruvate kinase (*Roche*), 4 mM phosphoénolpyruvate (*Roche*) et, le cas échéant, 0.1-0.5 mM orthovanadate. 200  $\mu$ g de protéines (dans des vésicules de membrane) sont incubés à 30 ou 37°C dans 1 ml de ce tampon pendant ~100 secondes avant d'ajouter la drogue fluorescente. Après stabilisation de la fluorescence (2-3 minutes plus tard), le transport est déclenché par l'ajout de 2 mM ATP et la variation de fluorescence est suivie pendant 5-10 minutes.

Une autre méthode a été employée pour étudier le transport du **BCECF**, un indicateur fluorescent de pH (cf. Annexe C pour sa structure chimique). Ses propriétés de fluorescence ne permettant pas une détection en temps réel du transport, nous avons employé une mesure d'accumulation du BCECF qui a été mise au point pour l'étude du transporteur MRP1 (ABCC1) au sein de vésicules de membranes d'érythrocyte (Wesolowska *et al.* 2005). Ainsi, les vésicules de membrane inversées contenant le transporteur d'intérêt (1 mg/ml de protéines membranaires totales) sont incubées avec le fluorophore pendant 30 minutes à 30°C et à l'abri de la lumière en présence de 7 mM ATP (ou 7 mM AMPPNP comme contrôle), dans un tampon contenant 50 mM Hepes KOH pH 8, 250 mM saccharose, 8.5 mM NaCl, 7 mM  $MgCl_2$ , 10 mM

PEP et 20 µg/ml PK. La réaction est arrêtée par l'ajout de tampon HES froid (50 mM Hepes KOH pH 8, 20 mM EDTA, 250 mM saccharose) de façon à avoir une concentration finale d'EDTA de 12 mM. Les vésicules sont alors centrifugées pendant 30 minutes à 100000 *xg* et le culot membranaire est lavé 3-fois avec le tampon HES avant d'être solubilisé dans 50 mM Hepes KOH pH 8, 1% (v/v) Triton X-100. L'intensité de fluorescence de l'échantillon est ensuite déterminée au spectrofluorimètre. Une gamme étalon de BCECF est réalisée dans le même tampon (s'avérant linéaire dans l'intervalle de concentrations pertinentes pour cette étude), ce qui permet de remonter à la quantité de BCECF présente dans l'échantillon. Il a été également vérifié que la présence de vésicules membranaires ne modifie pas la fluorescence observée du BCECF.

### *Mesures de sensibilité aux antibiotiques*

La capacité de survie à divers antibiotiques a été étudiée pour les souches *B. subtilis* sauvage et  $\Delta yheI/yheH$ , ainsi que pour *E. coli* KAM32 ou KZM120 exprimant YheI/YheH sauvage et mutant, aussi bien en milieu solide qu'en milieu liquide, en suivant les protocoles décrits ci-dessous.

#### **Méthode de diffusion en milieu solide**

Des cultures de *B. subtilis* et d'*E. coli* KAM32 dans du milieu Mueller Hinton (supplémenté avec ampicilline pour les cellules KAM32 transformées avec les plasmides 18ih ou 18ih K377A/K469A) sont incubées à 37°C jusqu'à atteindre une  $DO_{600nm}$  de 0.6. 250 µl de ces cultures sont alors mélangées avec 3.5 ml de *Top Agar* à 45°C (milieu Mueller Hinton, 0.7% (w/v) agar et, si besoin, 100 µg/ml ampicilline et 0.5 mM IPTG). Le mélange est ensuite étalé sur une boîte de Pétri préchauffée à 37°C contenant du milieu Mueller Hinton avec 1.5% (w/v) agar. Après solidification et incubation de la boîte pendant 30 minutes à 37°C, une goutte (2 µl) des antibiotiques et drogues suivants a été déposée dans le centre de la boîte: 50 mg/ml kanamycine (*Euromedex*), 50 mg/ml spectinomycine (*Calbiochem*), 10 mg/ml céphalosporine (*Sigma*), 10 mg/ml chloramphénicol (*USB*), 10 mg/ml doxorubicine (*Sigma*), 10 mg/ml bromure d'éthidium (*USB*). La vancomycine a été appliquée sous forme de disque contenant 30 µg d'antibiotique (*Fluka*). Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 16 heures et les diamètres des halos d'inhibition ont été mesurés.

#### **Méthode de dilution en milieu liquide**

Cette méthode (Amsterdam 1996) permet de déterminer la concentration minimale (MIC) d'un antibiotique inhibant la croissance d'une souche donnée en milieu liquide. Des dilutions en cascade au 1/2 d'une solution stock d'antibiotique concentré sont préparées dans du milieu Mueller Hinton dans une plaque de 96 puits. Les souches bactériennes sont cultivées

comme décrit ci-dessus et un même volume de culture est ajouté dans chaque puits. La plaque est alors incubée à 37°C jusqu'à ce que les cultures atteignent une densité satisfaisante (16 heures typiquement). L'évaluation de la plaque est faite visuellement (pour déterminer la concentration minimale à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée) ou à l'aide d'un lecteur d'absorbance pour microplaques. Dans ce cas, on peut déterminer la concentration minimale d'antibiotique qui inhibe la croissance bactérienne à plus de 50% (MIC<sub>50</sub>) ou de 90% (MIC<sub>90</sub>).

# RESULTATS ET DISCUSSION

<b>L'expression recombinante de Rv1747 .....</b>	<b>113</b>
<b>Etude de Rv1747 dans des vésicules membranaires .....</b>	<b>121</b>
<b>Yhel/YheH : un transporteur ABC hétérodimérique.....</b>	<b>125</b>
<b>Yhel/YheH : un transporteur ABC de multiples drogues.</b>	<b>132</b>
<b>Quelle fonction physiologique pour Yhel/YheH ? .....</b>	<b>137</b>
<b>Purification de l'hétérodimère Yhel/YheH .....</b>	<b>150</b>
<b>Reconstitution du transporteur Yhel/YheH .....</b>	<b>163</b>
<b>Etude des mutants catalytiques de Yhel/YheH.....</b>	<b>172</b>



## L'EXPRESSION RECOMBINANTE DE Rv1747

Trois aspects du transporteur Rv1747 ont attiré notre attention et motivé cette étude :

- ∞ Rv1747 présente une topologie « inverse », avec le domaine nucléotidique situé en N-terminal du domaine transmembranaire. Cette topologie NBD-TMD, caractéristique de la sous-famille G des transporteurs ABC humains, est très rare chez les bactéries. Comme indiqué dans le tableau 6, cette topologie est absente chez *B. subtilis* et le seul représentant chez *M. tuberculosis* est le transporteur Rv1747.
- ∞ L'homologie de Rv1747 avec des transporteurs eucaryotes est souvent plus importante qu'avec de nombreux transporteurs procaryotes. Il serait apparenté au transporteur de multiples drogues ABCG2 humain, ainsi qu'à ABCG19 (ATWBC19) et ABCG36 (AtPDR8) d'*Arabidopsis thaliana*, impliqués respectivement dans la résistance aux antibiotiques (Mentewab *et al.* 2005) et aux pathogènes (Kobae *et al.* 2006; Stein *et al.* 2006).
- ∞ La présence de domaines FHA dans Rv1747 (et ses homologues) est une propriété unique parmi les transporteurs ABC connus. Via ses deux domaines FHA, le transporteur Rv1747 pourrait interagir avec des phosphoprotéines et être lui-même phosphorylé. En amont de ce travail de thèse et en collaboration avec notre équipe, le groupe du Dr. V. Molle (IBCP, Lyon) avait en effet montré que le domaine cytosolique de Rv1747 (comprenant les deux domaines FHA et le domaine cytosolique, cf. fig. 24) est phosphorylé *in vitro* par le domaine cytosolique de la kinase PknF (Molle *et al.* 2004). En revanche, cette étude n'a pu identifier aucun effet de la phosphorylation sur l'activité ATPase du domaine nucléotidique.

Afin de mieux comprendre le mode de fonctionnement de ce transporteur singulier, nous avons abordé l'étude de la protéine entière (l'étude évoquée ci-dessus ne concernait en effet que son domaine cytosolique). Le gène *rv1747* avait été cloné dans le plasmide pET19b par V. Molle à partir de l'ADN génomique de *M. tuberculosis* H37Rv (cf. Matériels et Méthodes), de façon à pouvoir exprimer la protéine avec une étiquette hexahistidine N-terminale chez *Escherichia coli*. Le système d'expression d'*E. coli* s'était avéré approprié pour l'étude de BmrA, un transporteur ABC de *Bacillus subtilis* précédemment caractérisé par le groupe de J.-M. Jault. Un degré important d'expression et un adressage correct à la membrane de BmrA avaient notamment été atteints, ce transporteur pouvant représenter plus de 50% des protéines membranaires totales (Steinfels *et al.* 2002).

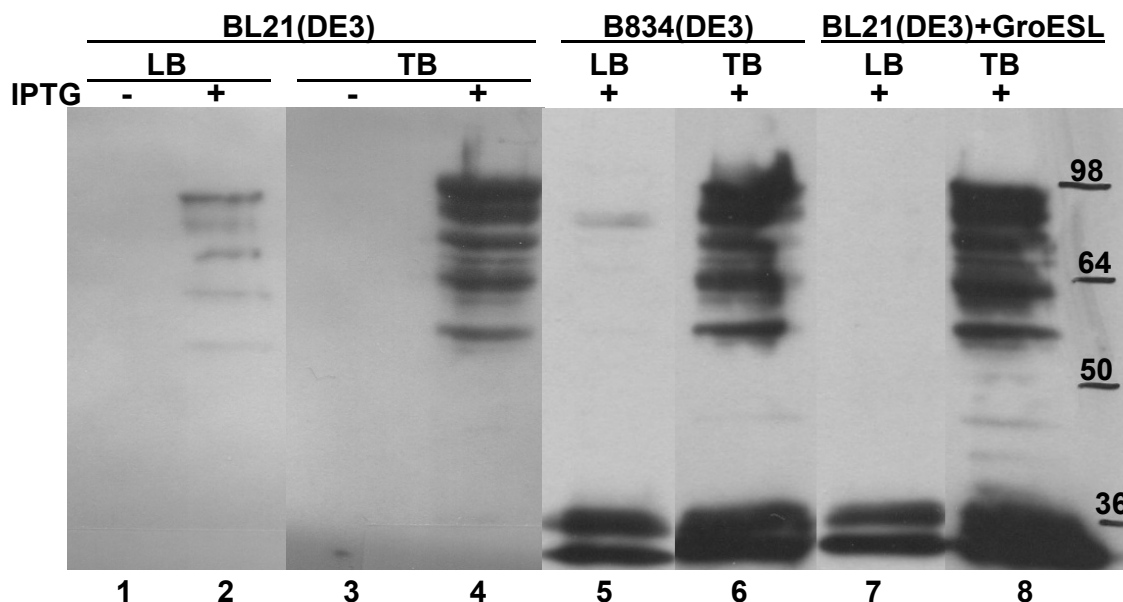
Dans un premier temps, nous avons utilisé la souche BL21(DE3) et réalisé une induction « classique » pendant 3 heures à 37°C. Il s'est avéré que le milieu Luria Bertani (LB) donne lieu à une production très faible de la protéine ; en revanche, le milieu TurboBroth (TB) améliore sensiblement le niveau d'expression, ceci également en utilisant d'autres souches bactériennes (cf. fig. 26). Une bande est visible correspondant à la taille attendue pour la protéine Rv1747 (95 kDa), mais, de façon inattendue, un ensemble de bandes de taille

inférieure sont également détectées par l'anticorps. Etant donné que la protéine possède une étiquette hexahistidine N-terminale, les fragments visibles sur le Western Blot possèderaient tous la même extrémité N-terminale. Cela pourrait signifier que la protéine est dégradée par protéolyse lors de la production ou de la lyse des cellules, ou alternativement que la traduction s'arrête à plusieurs positions sans compléter la synthèse de la protéine.

### *L'hypothèse de la dégradation protéolytique*

Dans le cas d'une dégradation protéolytique, celle-ci ne semblerait pas se produire lors de la lyse des cellules, puisque l'ajout d'inhibiteurs de protéases dans cette étape ne modifie pas le profil de bandes obtenues (données non montrées). Une dégradation intracellulaire pourrait être induite par un mauvais repliement et/ou un mauvais adressage à la membrane de la protéine Rv1747. Afin de tester cette hypothèse et améliorer, le cas échéant, la qualité de l'expression, plusieurs stratégies ont été conçues :

- ∞ Utilisation de souches bactériennes caractérisées par une vitesse réduite de production protéique
- ∞ Emploi de chaperonnes
- ∞ Adressage de la protéine à la membrane externe d'*E. coli*
- ∞ Diminution de la température lors de l'induction



**Figure 26. Expression de Rv1747 dans différentes souches. Effet du milieu de culture.** Les souches indiquées ont été transformées avec le plasmide 19Rv, cultivées dans le milieu Luria Bertani (LB) ou TurboBroth (TB) et l'expression de la protéine a été induite en incubant les cultures avec 0.5 mM IPTG pendant 3 heures à 37°C (cf. Matériels et Méthodes). BL21(DE3)+GroESL est une souche BL21(DE3) portant le plasmide pRep4groESL (Amrein *et al.* 1995) permettant la coexpression des chaperonnes GroES et GroEL d'*E.coli* avec la protéine d'intérêt. Dans les pistes 1-4 ont été déposées les protéines provenant de ~20 µl de culture à  $DO_{600nm}$  1.8-3 ; les pistes 5-8 correspondent à ~30 µl de culture à  $DO_{600nm}$  1.9-2.4. Après électrophorèse dans un gel dénaturant à 10% acrylamide, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF et une immunodétection anti-histidine a été réalisée (cf. Matériels et Méthodes). A droite est indiquée la taille des marqueurs de poids moléculaire (en kDa).



Le repliement correct d'une protéine peut être favorisé par un taux de transcription et/ou traduction modéré, qui diminue généralement le risque de formation d'agrégats. Dans le cas des protéines membranaires, des agrégats cytoplasmiques seraient notamment formés à cause de la saturation des systèmes d'insertion dans la membrane (Wagner *et al.* 2007).

Dans le but d'exploiter cette propriété, trois souches ont été sélectionnées ici censées réaliser la synthèse protéique à une vitesse plus lente que BL21(DE3). La souche B834(DE3), dérivée de BL21(DE3) et auxotrophe pour la méthionine, avait donné auparavant de bons résultats pour la surexpression de protéines membranaires (V. Molle, communication personnelle). Il est envisageable qu'une concentration éventuellement limitante en méthionine ralentisse de manière bénéfique la production protéique. De plus, nous avons choisi deux autres souches dérivées de BL21(DE3) obtenues par B. Miroux, C41(DE3) et C43(DE3). Ces souches sont capables de produire quelques protéines membranaires et solubles qui s'expriment difficilement dans la souche d'origine BL21(DE3), grâce vraisemblablement à un taux réduit de transcription (Miroux *et al.* 1996). Cette propriété réside en une mutation dans le promoteur *lacUV5* qui contrôle la synthèse de la T7 ARN polymérase en réponse à l'IPTG, résultant en une synthèse réduite de cette enzyme (Wagner *et al.* 2008).

La souche C41(DE3), qui avait permis de produire le transporteur BmrA avec un très bon rendement, s'est avérée inappropriée pour l'expression de Rv1747 (cf. fig. 27A). Dans deux expériences indépendantes, le taux d'expression était pratiquement nul. C43(DE3) permet la production d'un peu plus de protéine, mais toujours à un niveau remarquablement plus bas que BL21(DE3) (cf. fig. 27A). Ce résultat est d'autant plus surprenant qu'aucune des 17 protéines testées dans C41(DE3) par B. Miroux montrait un degré d'expression moins important que dans BL21(DE3), et seulement une était moins abondamment produite dans C43(DE3) (Miroux *et al.* 1996). De même, seules deux sur les 15 protéines membranaires étudiées par Wagner *et al.* (2008) s'expriment mieux dans BL21(DE3) qu'en C41(DE3). Enfin, l'utilisation de B834(DE3) donne lieu à un niveau d'expression comparable à BL21(DE3), sans néanmoins modifier le profil des bandes (cf. fig. 26, piste 6).

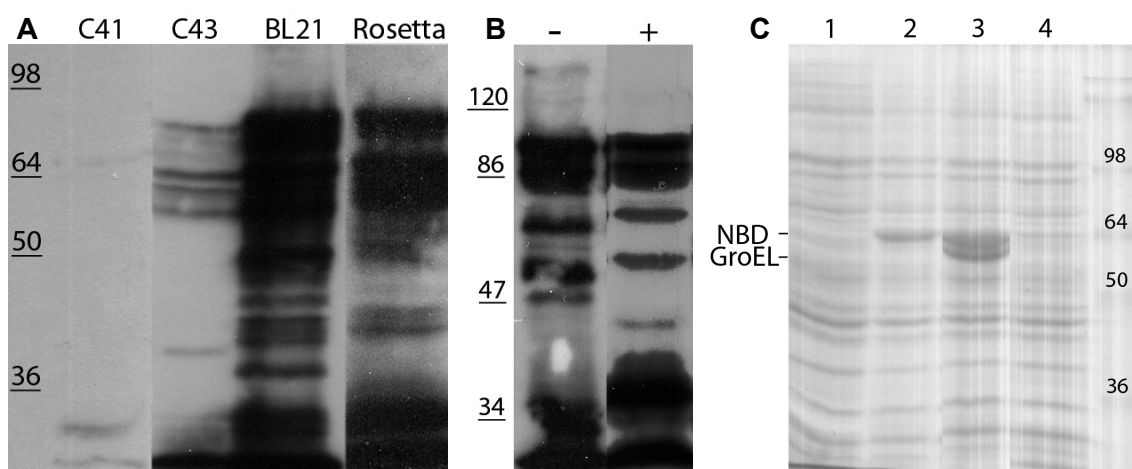
Dans un deuxième temps, nous avons testé l'effet de chaperonnes sur l'expression de Rv1747. L'utilisation de chaperonnes a été depuis plus de dix ans une des stratégies les plus récurrentes pour améliorer le rendement et la solubilité des protéines produites de façon hétérologue, ainsi que pour favoriser le repliement post-traductionnel de protéines produites sous forme de corps d'inclusion (Amrein *et al.* 1995; Yokoyama *et al.* 1998; de Marco *et al.* 2007). De plus, la chaperonne GroEL semble capable de s'associer à des protéines membranaires en solution, de les maintenir solubles en absence de détergent, ainsi que d'induire leur incorporation dans des liposomes (Deaton *et al.* 2004).

Dans ce travail, les chaperonnes GroES et GroEL d'*E. coli* ont été coexprimées avec Rv1747 à partir du plasmide construit par Amrein *et al.* (1995). La figure 27C montre les résultats obtenus pour l'expression du NBD de Rv1747, où l'on constate que le rendement semble légèrement augmenté en coexprimant les chaperonnes (cf. fig. 27C, piste 3 vs. 2). Les

mêmes observations ont été réalisées sur la protéine Rv1747 entière ; cependant, la multiplicité de bandes obtenues ne semble pas diminuer en présence des chaperonnes (cf. fig. 26, piste 8).

Puisque les chaperonnes endogènes d'*E. coli* (surtout DnaK/DnaJ/GrpE et GroES/GroEL) sont induites lors d'un stress thermique (Arsene *et al.* 2000), le traitement de cultures bactériennes avec un choc thermique a été également exploitée pour la production de protéines recombinantes (Heitzer *et al.* 1992). Nous avons ainsi testé la surexpression de Rv1747 suite à l'incubation de la culture bactérienne à une température élevée (42°C pendant 30 minutes). Contrairement à nos attentes, ce traitement s'est avéré désavantageux pour l'expression de cette protéine, diminuant le rendement obtenu (résultat non montré).

Par ailleurs, l'enzyme thiorédoxine est également utilisée dans le but d'améliorer la qualité des protéines produites, grâce notamment à son activité de réduction de ponts disulfure (Yasukawa *et al.* 1995; Berndt *et al.* 2008). Etant donné que cinq cystéines sont présentes dans la séquence de Rv1747, nous avons étudié l'effet de la coexpression de la thiorédoxine d'*E. coli* à partir du plasmide construit par Yasukawa *et al.* (1995) sur la synthèse de Rv1747. De façon inattendue, la présence de cette enzyme entraîne une diminution de la quantité de Rv1747 obtenue, de la protéine entière (résultat non montré) comme du NBD isolé (cf. fig. 27C, piste 4 vs. 2).



**Figure 27. A :** Expression de Rv1747 dans différentes souches dérivées de BL21(DE3). Les souches C41(DE3) et C43(DE3) ont été développées par B. Miroux *et al.* (1996), la souche Rosetta(DE3) contient le plasmide pRARE pour la synthèse des ARNt pour 6 codons rares (cf. texte). Les cultures ont été réalisées dans du milieu TurboBroth. Western Blot anti-histidine réalisé dans les conditions décrites pour la fig. 26, pistes 4-8.

**B : Expression in vitro de Rv1747** en absence (-) ou présence (+) d'inhibiteurs de protéases (*Complete<sup>TM</sup>*, Roche). Western-Blot anti-histidine, 5µl du volume réactionnel ont été déposés dans chaque puits. Cf. Matériels et Méthodes pour les conditions de la réaction de synthèse.

**C :** Expression du NBD de Rv1747 en présence des chaperonnes GroES/GroEL et de la thiorédoxine. Gel de polyacrylamide (10%) contenant les protéines totales de cultures de B834(DE3) transformées avec le plasmide 19RvNBD non induites (1), ou induites avec 1 mM IPTG (2-4). Les chaperonnes GroES/GroEL (3) et la thiorédoxine (4) d'*E. coli* ont été coexprimées à partir des plasmides construits par Amrein *et al.* (1995) et Yasukawa *et al.* (1995), respectivement. L'expression de la thiorédoxine (4), avec un poids moléculaire attendu de 11 kDa, a été vérifiée sur un gel de concentration d'acrylamide plus élevée (16%). Tailles attendues : NBD de Rv1747, 62 kDa ; GroEL, 57 kDa ; GroES 10 kDa. Marqueurs de poids moléculaire indiqués en kDa.

Le repliement et l'adressage sont deux étapes indissociables pour les protéines membranaires. Leur insertion dans la membrane est effectuée de façon co-traductionnelle, suite à la reconnaissance du premier segment transmembranaire, et le repliement et l'adoption de la structure native se font déjà dans l'environnement membranaire (Abdallah *et al.* 2007). Il est donc possible que le profil de bandes qu'on observe pour la protéine Rv1747 recombinante soit lié à un défaut d'adressage à la membrane.

Une stratégie qui a été mise en place avec succès pour l'expression hétérologue d'une porine de *M. tuberculosis* (OmpATb) est son adressage à la membrane externe d'*E. coli* en introduisant dans son extrémité N-terminale le signal d'adressage de la porine endogène OmpA (Molle *et al.* 2006). Cependant, cette stratégie n'a pas donné les mêmes résultats pour Rv1747, l'introduction du signal d'adressage d'OmpA a résulté en une diminution importante de la quantité de protéine produite (cf. fig. 29, piste 6). Il faut noter que la méthode employée dans ce travail pour la préparation de fractions membranaires (i.e. centrifugation différentielle après lyse des cellules dans une Presse de French) ne permet pas de séparer les membranes interne et externe (Chai *et al.* 1977).

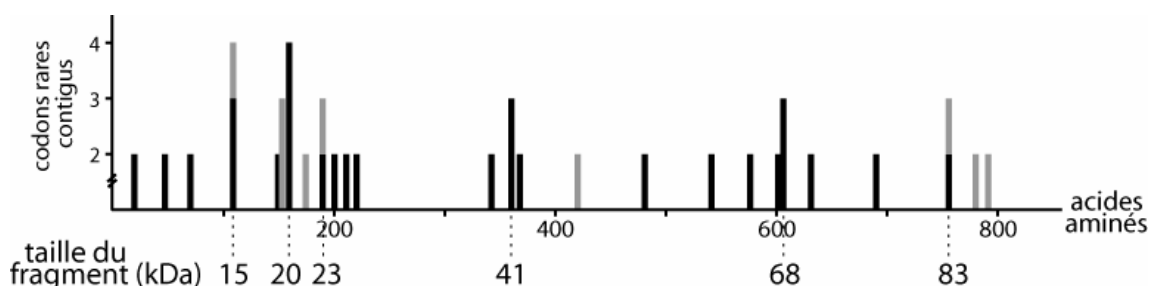
Un autre facteur influant sur l'adressage et le repliement des protéines est la température, qui agit notamment sur la vitesse de la production protéique. Une température basse favorise l'adressage à la membrane des protéines et leur repliement correct (Chen *et al.* 2003b). Nous avons exploré l'effet de ce paramètre sur l'adressage de Rv1747 et observé en effet que la quantité de protéine incorporée dans la membrane à 25°C est plus importante que si l'induction est effectuée à 37°C, malgré le fait que la quantité totale de protéine synthétisée à 37°C soit plus importante qu'à 25°C (résultats non montrés). En revanche, le profil de bandes de la protéine est comparable aux deux températures (cf. fig. 29 piste 1 vs. fig. 26).

Finalement, nous avons eu recours à un système de synthèse acellulaire dans un double but : (i) ces systèmes permettent une synthèse en présence de détergent et s'affranchissent des difficultés potentielles liées à l'insertion dans une membrane lipidique ; (ii) un meilleur contrôle de la protéolyse est possible, les inhibiteurs de protéases pouvant être inclus dans le milieu réactionnel et agir pendant la synthèse protéique. Après avoir préparé une construction plasmidique appropriée au système de synthèse *in vitro* (cf. Matériels et Méthodes pour plus de détails), la réaction a été réalisée en présence des détergents Brij 35 et Brij 58, qui avaient été précédemment utilisés avec succès pour synthétiser *in vitro* des protéines membranaires et les maintenir en solution (Klammt *et al.* 2005). Les résultats obtenus (cf. fig. 27 centre pour la synthèse réalisée en présence de Brij 35, mêmes profils obtenus pour Brij 58) montrent un profil de bandes très similaire à celui obtenu dans le système cellulaire, indiquant que, dans le cas de Rv1747, la synthèse en présence de détergent ne présente aucun avantage significatif par rapport au système membranaire. De plus, l'ajout d'inhibiteurs de protéases n'a pas d'effet majeur sur le profil de bandes obtenu, ce qui nous a conduit à écarter l'hypothèse d'une dégradation protéolytique.

### L'hypothèse de l'arrêt traductionnel

Etant donnée la reproductibilité du profil de bandes obtenu dans les différentes expériences de synthèse de Rv1747, il est envisageable que ces bandes (ayant toutes la même extrémité N-terminale qui est reconnue par l'anticorps anti-histidine) correspondent non pas à une dégradation mais à une synthèse protéique tronquée à plusieurs reprises. La présence de codons rares dans un gène provenant d'un organisme avec un usage de codons éloigné de celui d'*E. coli* peut induire des défauts traductionnels dans cet hôte, voire des arrêts ribosomiques (Sorensen *et al.* 2005). Non seulement la proportion de codons rares dans une séquence conditionne sa traduction correcte dans le système hétérologue, mais surtout leur distribution semble décisive, les successions de codons rares étant d'autant plus désavantageuses (Kane 1995). On classe arbitrairement un codon comme rare si son abondance relative dans les séquences codantes d'*E. coli* est inférieure à 1% (Kane 1995). Prenant comme référence l'ensemble de codons synonymes pour un acide aminé donné, les codons rares représentent, en général, un pourcentage inférieur à 20%.

L'analyse de la séquence du gène *rv1747* à l'aide du serveur *Graphical Codon Usage Analyzer* (cf. fig. 28) permet d'identifier des codons rares, les classifiant en fonction de leur fréquence relative à l'ensemble des codons synonymes chez *E. coli*. 6,7% des triplets de *rv1747* correspondent à des codons de fréquences inférieures à 10%, et 15,5% des triplets sont sous le seuil de 20%. Quant à la distribution, plusieurs enchaînements allant de 2 à 4 codons rares contigus sont identifiés tout au long de la séquence de *rv1747* (cf. fig. 28). Dans le scénario d'un arrêt traductionnel induit à partir de trois ou plus codons rares contigus, environ 6 fragments protéiques sont attendus, dont les tailles sont indiquées dans la figure 28. En regardant les profils obtenus (cf. figs. 26 et 27), il apparaît que ce scénario n'explique pas complètement les bandes observées, puisque des fragments additionnels sont générés par exemple vers 50 et 60 kDa. D'autres arrêts de traduction sembleraient se produire en plus de ceux causés par trois ou quatre codons rares successifs. Un codon rare isolé peut également donner lieu à des arrêts traductionnels (Kane 1995), et des régions riches en codons rares, mais non successifs, seraient également néfastes à l'expression (Kim *et al.* 2006).



**Figure 28. Distribution des codons rares contigus dans le gène *rv1747*.** Les codons rares (dont l'abondance chez *E. coli* correspond à moins de 20% de l'ensemble des codons synonymes) ont été identifiés à l'aide du serveur *Graphical Codon Usage Analyzer* (<http://gcu.schoedl.de/>). Sont indiqués en bas de la figure les poids moléculaires calculés pour les fragments issus des arrêts traductionnels se produisant hypothétiquement par l'enchaînement de plus de deux codons rares. Sont représentés en gris les codons dont l'ARN de transfert est fourni par le plasmide pRARE de la souche Rosetta.

Afin de confirmer que les problèmes rencontrés dans l'expression de Rv1747 proviennent surtout d'arrêts traductionnels et non pas d'une protéolyse, l'étiquette hexahistidine a été placée à l'extrémité C-terminale de Rv1747. Suite à l'expression de cette protéine, une bande majeure est détectée par l'anticorps anti-histidine, correspondant à la taille de la protéine entière (cf. 29, piste 5). À part la protéine entière, seulement une autre bande, d'environ 60 kDa, est visible, indiquant que la protéolyse est négligeable (sauf si celle-ci est catalysée par des carboxypeptidases, mais cela résulterait en un profil continu de bandes de la protéine étiquetée en N-terminale).

Dans le but de limiter les problèmes de terminaison précoce posés par les codons rares, des plasmides ont été développés (système *CodonPlus* de *Stratagene* ou plasmides pRARE de *Novagen*) contenant des copies supplémentaires des ARN de transfert peu abondants chez *E. coli*. Nous avons eu recours dans cette étude à la souche Rosetta(DE3) (*Novagen*), contenant des ARNt additionnels pour les codons AGA, AGG, GGA, AUA, CUA et CCC. Ces codons correspondent environ à un quart de ceux identifiés dans la séquence de *rv1747* (avec un seuil de 20%), mais quelques uns seulement des enchaînements montrés dans la figure 28 seraient alors potentiellement ciblés. L'expression dans la souche Rosetta(DE3) (cf. fig. 27A) permet de réduire légèrement le nombre de bandes obtenues (notamment une bande vers 50 kDa), mais cette souche semble néanmoins loin d'être satisfaisante pour l'expression de Rv1747.

Le système alternatif *CodonPlus* complète les mêmes ARNt que la souche Rosetta, mais en nombre moins important (entre 3 et 5, selon la souche). Une de ces souches, BL21-CodonPlus(DE3)-RP (qui porte une copie supplémentaire des ARNt correspondants à AGA, AGG et CCC) a été utilisée pour l'expression haut débit de protéines membranaires de *M. tuberculosis* (Korepanova *et al.* 2005; Qin *et al.* 2008), mais l'expression de Rv1747 n'a été abordée dans aucune de ces deux études. 70% des protéines étudiées ont pu être exprimées dans cette souche BL21-CodonPlus(DE3)-RP, ce taux descend à 33% pour les protéines avec plus de quatre segments transmembranaires prédits (Korepanova *et al.* 2005). Cependant, la détectabilité de la protéine d'intérêt (soit par coloration au bleu de Coomassie ou par immunodétection) est le seul critère rapporté, et aucun Western Blot n'est montré dans ces travaux, ce qui nous aurait été utile pour comparer avec nos résultats. De façon intéressante, la souche C43(DE3) a été utilisée par Korepanova *et al.* (2005) dans le but de produire les protéines réfractaires. Cette souche a permis d'exprimer 12% des protéines indétectables chez BL21-CodonPlus(DE3)-RP.

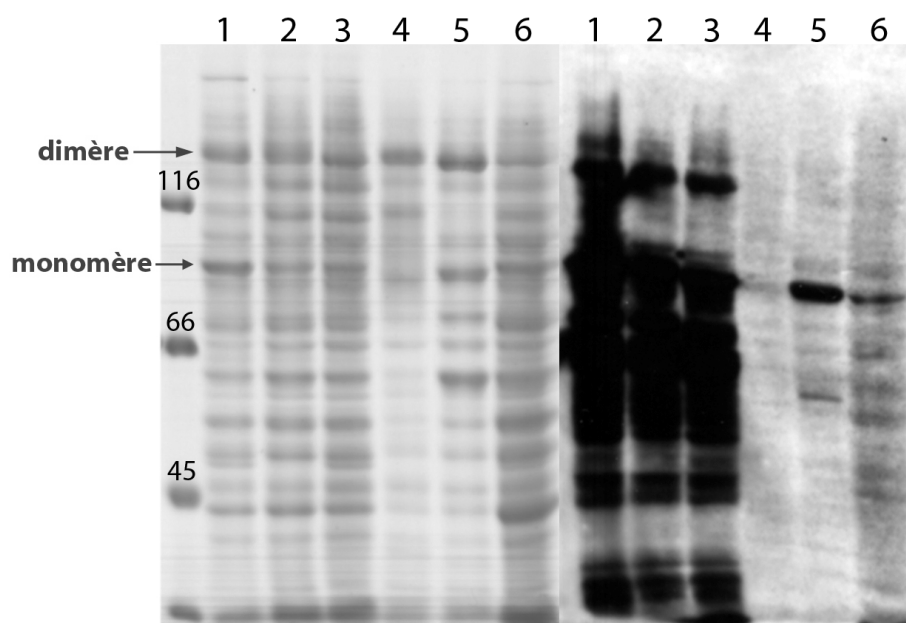
À ce stade, nous nous sommes tournés vers des systèmes d'expression mycobactériens. *M. bovis* BCG et *M. smegmatis* ont été utilisés avec succès pour l'expression et la purification de protéines membranaires de *M. tuberculosis* (Alahari *et al.* 2007; Siroy *et al.* 2008). V. Molle (Lyon) a introduit à cette fin le gène *rv1747* dans un vecteur d'expression pour mycobactéries (Alahari *et al.* 2007), mais la transformation subséquente de *M. bovis* ou *M. smegmatis*, réalisée par L. Kremer (Montpellier), a donné lieu à des transformants dont aucun

ne possédait le gène intact. Des délétions et inversions du gène *rv1747* s'étaient produites dans ces transformants, indiquant vraisemblablement une forte toxicité associée à l'expression de la protéine Rv1747 chez ces bactéries.

Nous conduisons une réflexion à l'heure actuelle sur la possibilité de synthétiser un gène optimisé pour l'expression chez *E. coli*. Cette approche coûteuse a été utilisée avec succès (Sorensen *et al.* 2005), mais des cas ont été rapportés où le taux d'expression a été encore diminué suite au remplacement de codons rares, ceci vraisemblablement à cause d'une modification concomitante de la structure secondaire de l'ARN messager (Wu *et al.* 2004). La structure secondaire de l'ARNm peut jouer un rôle important dans sa stabilité, notamment face aux RNAses, et conditionner ainsi le rendement de l'expression.

## ETUDE DE Rv1747 DANS DES VESICULES MEMBRANAIRES

Malgré les difficultés rencontrées lors de l'expression de Rv1747, nous avons voulu caractériser les membranes d'*E. coli* contenant la protéine, afin de vérifier si la proportion de protéine entière présente dans les fractions membranaires est suffisante pour détecter une activité attribuable au transporteur. L'analyse des vésicules de membranes inversées (IMVs) contenant His<sub>6</sub>-Rv1747 (cf. fig. 29, pistes 1-3) révèle la présence non seulement de la bande correspondant au monomère, mais également d'une bande qui contient vraisemblablement du dimère de Rv1747 résistant au SDS. Cela indiquerait que la protéine synthétisée est dans une conformation apte à la dimérisation et donc possiblement proche de la native. De façon inattendue, le dimère formé par la protéine Rv1747-His<sub>6</sub>, bien que visible après coloration au bleu de Coomassie, n'est pas détecté par l'anticorps anti-histidine (cf. fig. 29, piste 5). L'étiquette hexahistidine en position C-terminale devient probablement masquée au sein du dimère. Il est à noter également que la plupart des bandes qui étaient détectées dans l'extrait total bactérien sont retrouvées dans la fraction membranaire, bien que les fragments N-terminaux de tailles jusqu'à ~60 kDa soient censés être solubles. Ceci pourrait s'expliquer par l'association de ces fragments avec des molécules entières de Rv1747 insérées dans la membrane, étant donnée la capacité de dimérisation de la protéine.



**Figure 29. Vésicules de membrane inversées contenant Rv1747.** (1) His<sub>6</sub>-Rv1747 sauvage ; (2) His<sub>6</sub>-Rv1747 K358A ; (3) His<sub>6</sub>-Rv1747 E479Q ; (4) Rv1747 sauvage non étiqueté ; (5) Rv1747-His<sub>6</sub> sauvage ; (6) His<sub>6</sub>-Rv1747 modifié avec le signal d'adressage d'OmpA d'*E. coli*. Les vésicules ont été obtenues à partir de cultures de B834(DE3) induites avec 1 mM IPTG pendant 16 heures à 25°C, coexprimant les chaperonnes GroES et GroEL d'*E. coli*. 15 µg de protéines membranaires ont été déposées dans chaque puits et soumises à électrophorèse sur gel de 10% acrylamide. A gauche est montré le gel coloré au bleu de Coomassie, à droite le résultat de l'immunodétection anti-histidine. Les bandes correspondant putativement au monomère et au dimère de Rv1747 sont signalées. Dans la piste de gauche est indiquée la taille des marqueurs de poids moléculaire en kDa.

Nous avons commencé la caractérisation des IMVs par des mesures d'activité ATPase, consistant à doser le phosphate libéré lors de l'incubation des vésicules membranaires avec de l'ATP (cf. Matériels et Méthodes). Les membranes contenant Rv1747 sauvage (cf. fig. 29 piste 1) présentent une activité ATPase correspondant à 80% de celle observée avec des membranes obtenues à partir de bactéries transformées avec un plasmide vide (données non montrées). Ce résultat suggère que la protéine Rv1747 présente dans la fraction membranaire obtenue n'est pas active, ou que son activité ATPase est trop faible pour être détectée dans nos conditions. La différence observée de 20% pourrait être due au fait que les ATPases membranaires autres que Rv1747 sont relativement plus abondantes dans les vésicules contrôles étant donnée l'absence de Rv1747 (pour une quantité identique de protéines totales).

L'étude réalisée précédemment avec le domaine nucléotidique de Rv1747 (fusionné à la glutathion-S-transférase) avait mise en évidence une très faible activité ATPase de ce NBD, détectable seulement en utilisant de l'ATP radioactif (Molle *et al.* 2004). Cependant, ceci ne constitue aucune valeur de référence, car l'activité ATPase des domaines nucléotidiques isolés peut être plus faible que celle des transporteurs ABC entiers, à cause probablement d'une dimérisation moins efficace en absence de domaines transmembranaires.

Notre hypothèse de travail était que la protéine Rv1747 pouvait constituer un exportateur de drogues chez *M. tuberculosis*. Afin de valider ou d'infirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'activité de transport des vésicules de membrane inversées (IMV) contenant Rv1747. Les drogues hydrophobes choisies étaient celles décrites comme substrat d'autres transporteurs MDR et possédant des propriétés de fluorescence qui permettent le suivi de leur transport en temps réel par spectrofluorimétrie (cf. Matériels et Méthodes). De par la topologie inversée des IMVs, les domaines nucléotidiques du transporteur ABC (cytoplasmiques) sont exposés vers l'extérieur des vésicules (cf. fig. 30, encadré). Après incubation des IMVs avec la drogue, qui s'incorpore préférentiellement dans la membrane de par son hydrophobicité, l'ATP est ajouté dans la solution pour déclencher le transport.

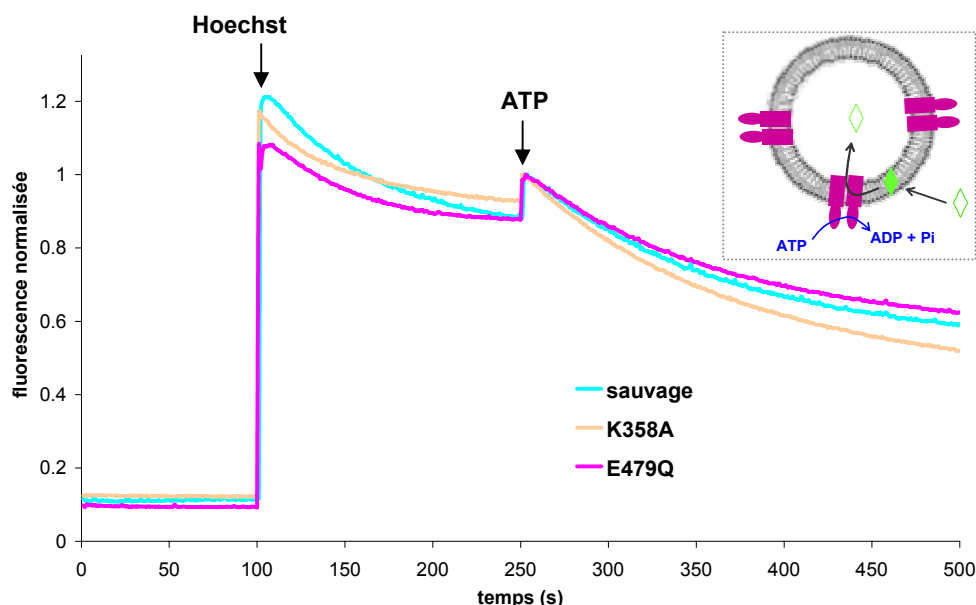
Parmi les drogues étudiées, aucune activité de transport n'a été détectée pour la doxorubicine, la daunorubicine, la mitoxantrone ou la 7-amino-actinomycine D (cf. Annexes A et D pour les structures chimiques de ces composés). Dans le cas du Hoechst 33342 (cf. Annexe D), une faible activité de transport est détectable, reflétée par une légère diminution de la fluorescence suite à l'ajout d'ATP (cf. fig. 30). Cette activité montre une dépendance remarquable par rapport à la température, aucun transport n'étant détecté en dessous de 37°C (données non montrées). La préincubation des IMVs avec le domaine cytosolique de la sérine/thréonine protéine kinase PknF, capable de phosphoryler le domaine cytosolique de Rv1747 (Molle *et al.* 2004), n'a pas modifié significativement leur activité de transport ou leur activité ATPase.

Afin de vérifier que le transport de Hoechst 33342 observé dans les IMVs est attribuable à la protéine Rv1747, les mutants catalytiques K358A et E479Q ont été construits : (i) La mutation K358A affecte la lysine conservée du motif A de Walker, qui est impliquée dans la



liaison du nucléotide dans le site actif. La mutation de cette lysine a été réalisée sur de nombreux transporteurs ABC, conduisant généralement à une diminution drastique de l'activité ATPase et de transport (Azzaria *et al.* 1989; Shyamala *et al.* 1991; Müller *et al.* 1996; Ramjeesingh *et al.* 1999). (ii) La mutation E479Q affecte le glutamate conservé qui suit le motif B de Walker. Ce carboxylate a été décrit comme la base catalytique de plusieurs transporteurs ABC (Urbatsch *et al.* 2000; Moody *et al.* 2002; Orelle *et al.* 2003), sa mutation entraînant l'abolition de l'activité ATPase.

Des IMVs ont été isolées contenant les protéines mutées (cf. fig. 29, pistes 2 et 3) et leur capacité à transporter la drogue Hoechst 33342 a été étudiée dans les mêmes conditions que pour les IMVs contenant la protéine sauvage. Comme illustré dans la figure 30, la diminution de fluorescence induite par l'ajout d'ATP est à peine modifiée par les mutations. Les légères différences observées pourraient être dues à l'erreur expérimentale lors de la mesure ou du dosage protéique des différentes préparations de membrane (cf. fig. 29). Ces résultats indiquent que le transport de Hoechst 33342 observé ne nécessite pas que Rv1747 soit capable d'hydrolyser l'ATP, ce qui suggère fortement que cette activité de transport du Hoechst 33342 n'est pas attribuable à Rv1747. Un contrôle additionnel a été ensuite réalisé, où des IMVs ont été isolées à partir des cellules transformées avec un plasmide vide. Ces IMVs montrent un taux de transport du Hoechst 33342 similaire à celui des IMVs contenant Rv1747, et une même dépendance par rapport à la température (résultats non montrés), ce qui confirme que des protéines autres que Rv1747 sont à l'origine de l'activité observée ici.



**Figure 30. Transport du Hoechst 33342 par des vésicules de membrane inversées contenant Rv1747 de type sauvage et les mutants K358A et E479Q.** Des IMVs (contenant 500 µg de protéines membranaires totales) sont incubées à 37°C pendant 100 secondes avant d'ajouter 1 µM Hoechst 33342. Après incorporation de la drogue dans la membrane et stabilisation de la fluorescence, 2 mM ATP sont ajoutés à t = 250 s. L'encadré montre la topologie d'un transporteur ABC dans une vésicule inversée, avec les domaines nucléotidiques (ovales) exposés vers l'extérieur et capables d'hydrolyser l'ATP ajouté dans le milieu. L'incorporation de la drogue (losange) dans la membrane augmente fortement sa fluorescence, et sa translocation vers l'intérieur aqueux des vésicules grâce à l'hydrolyse de l'ATP induit une diminution de sa fluorescence.

Il est possible que d'autres protéines dans les IMVs soient capables de transporter le Hoechst 33342. *E. coli* possède au moins 20 transporteurs de drogues capables de rendre la bactérie résistante à de nombreuses drogues<sup>17</sup> (Nishino *et al.* 2001), et une activité de transport de Hoechst 33342 a été montrée pour au moins deux protéines membranaires d'*E. coli*, le transporteur ABC MsbA (Reuter *et al.* 2003) et le transporteur MFS MdfA (Lewinson *et al.* 2003). Etant donné que l'ajout d'ATP induit la formation d'un gradient de protons dans les IMVs par la Fo-F<sub>1</sub> ATP synthase, des transporteurs secondaires tels que MdfA présents dans les vésicules pourraient également donner lieu à la translocation du Hoechst 33342 observée.

Comme les conditions d'expression de Rv1747 ne sont pas encore suffisamment optimisées, il est difficile de conclure à ce stade sur notre hypothèse de départ quant au rôle putatif de Rv1747 comme transporteur de drogues. Un taux d'expression plus élevé est nécessaire pour pouvoir mesurer dans des IMVs une activité de transport spécifique au-dessus du bruit de fond apporté par les autres transporteurs présents dans la membrane. Alternativement, des efforts pourraient être consacrés à la purification du transporteur une fois amélioré le problème des arrêts traductionnels et/ou en utilisant la construction portant l'étiquette hexahistidine en C-terminal. Cette dernière approche risquerait cependant de résulter en une protéine purifiée non homogène à cause de l'association probable entre des fragments non complets de Rv1747 et la protéine entière. Il faudrait ainsi trouver des conditions de solubilisation suffisamment stringentes pour dissocier les protéines tronquées, permettant néanmoins la réassociation par la suite d'un dimère fonctionnel.

---

<sup>17</sup> Le composé Hoechst 33342 ne faisait pas partie des drogues employées dans cette étude, mais d'autres composés tels que la rhodamine-6-G, le cristal violet, l'acriflavine ou le bromure d'éthidium ont été utilisés (cf. Annexes C et D).

## YHEI/YHEH : UN TRANSPORTEUR ABC HETERODIMERIQUE

### *Le chevauchement génique*

Les gènes *yheI* et *yheH* de *B. subtilis* sont organisés en opéron et présentent un chevauchement, le codon d'initiation de *yheH* se superposant à l'avant-dernier codon et au codon *stop* de *yheI* (cf. fig. 16A). En 3' de *yheH*, une séquence putative de terminaison de transcription a été identifiée (Kunst *et al.* 1997; Noback *et al.* 1998). Cet arrangement suggère que les deux gènes sont transcrits dans un même ARN messager et que leur traduction pourrait être couplée. Le concept de « couplage traductionnel » a été introduit en début des années 80 en étudiant chez *E. coli* l'opéron de protéines ribosomiques et les opérons tryptophane et galactose (Oppenheim *et al.* 1980; Yates *et al.* 1981; Schumperli *et al.* 1982). En partant d'une même quantité d'ARN messager polycistronique, le niveau de traduction des cadres de lecture en 3' peut notamment dépendre de la traduction correcte de celui en 5'.

Même si le chevauchement des cadres de lecture n'est pas indispensable au couplage traductionnel, la proximité entre le codon *stop* du premier et le codon d'initiation du deuxième cadre de lecture semble critique (Schumperli *et al.* 1982). En remplaçant la région intergénique de *galT* et *galK* (de l'opéron galactose) par la configuration ATGA (celle retrouvée pour *yheI* et *yheH*, cf. fig. 16A), ces auteurs ont observé un couplage traductionnel entre ces deux cadres de lecture. Ce résultat suggère que la traduction de *yheI* et *yheH* serait effectivement couplée.

Deux mécanismes pourraient rendre compte du couplage traductionnel : (i) Les ribosomes finissant la traduction du premier cadre de lecture commenceraient la synthèse de la deuxième protéine sans se détacher de l'ARN. (ii) Même s'ils se détachent, la concentration locale de sous-unités ribosomiques serait augmentée et favoriserait la traduction de la deuxième protéine. Cela pourrait notamment permettre la traduction même à partir de signaux de liaison de ribosome (*ribosome binding site* ou RBS) faibles. Ce cas n'est pas forcément pertinent pour *yheH*, puisque son RBS semble aussi fort que celui de *yheI*, ainsi que la nature du codon d'initiation et sa distance du RBS, qui peuvent elles aussi avoir une influence sur l'efficacité de traduction (cf. fig. 31).

	séquence RBS	start
consensus <i>B. subtilis</i>	AAAGGAGGTGAT---	ATG
séquence <i>yheI</i>	TG <b>AGGAGAT</b> GGG-----	ATG
séquence <i>yheH</i>	GA <b>AGGGGGAG</b> GCA-----	ATG

**Figure 31. Comparaison des régions 5' non traduites de *yheI* et *yheH* et comparaison avec le consensus pour *B. subtilis*.** Les consensus pour le RBS (*ribosome binding site*), le codon d'initiation (*start*) et la distance optimale entre les deux sont tirés de Vellanoweth *et al.* (1992) et Ma *et al.* (2002). Les séquences RBS putatives de *yheI* et *yheH* ont été proposées par Noback *et al.* (1998). Sont indiqués en gras les nucléotides qui coïncident avec le consensus. Il est intéressant de noter que les consensus pour *E. coli* sont très similaires (seulement une base différente dans le RBS ; Ma *et al.* 2002) ; de ce fait, des conclusions similaires peuvent être appliquées à l'expression hétérologue chez *E. coli*.

Une conséquence du couplage traductionnel, spécialement intéressant pour des protéines impliquées dans des complexes, est la production stœchiométrique des protéines concernées, ce qui représente donc un moyen de régulation à la fois fin et économique (aucun besoin de facteurs de traduction additionnels).

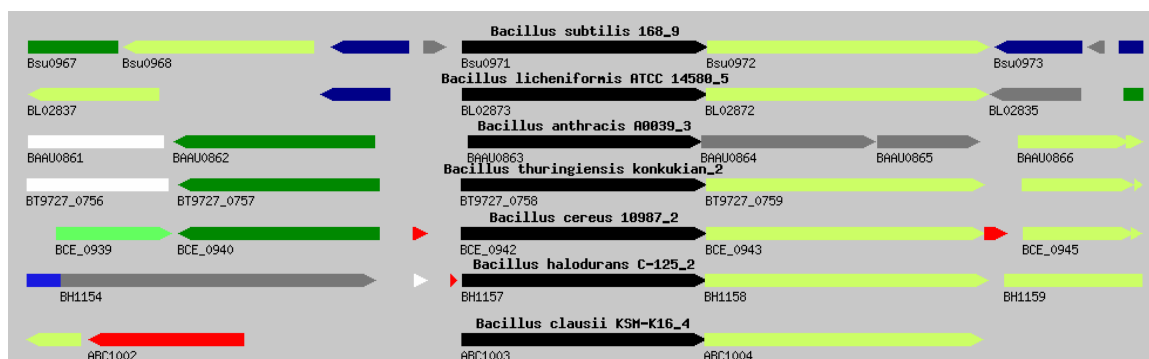
Une étude parue en 2004 portant sur les 198 génomes microbiens séquencés jusqu'à cette date révèle que le phénomène de superposition génique est fréquent dans tous ces génomes : environ un tiers de tous les gènes sont impliqués dans un chevauchement (Johnson *et al.* 2004). L'étude montre aussi que le nombre de superpositions est corrélée avec la taille du génome et n'est pas forcément un mécanisme de compacité du génome. Comme explications possibles au phénomène de chevauchement génique, les auteurs évoquent, d'une part, la capacité accrue de régulation de l'expression et, d'autre part, un raisonnement évolutif : les gènes montrant un chevauchement présentent un taux de conservation plus important que les autres. De façon intéressante, plus de 70% des chevauchements identifiés sont plus courts que 15 paires de bases, dont environ la moitié correspondent au type de *yheI/yheH* (i.e. gènes en tandem avec 4 paires de bases partagées). Comme mentionné plus haut, ce type de chevauchement permet un couplage traductionnel, ce qui permet aux auteurs de suggérer que le couplage traductionnel pourrait être une force évolutive pertinente pour la conservation évolutive des superpositions géniques.

Si l'on compare l'opéron *yheI/yheH* dans les genres de *Bacillus* dont le génome a été séquencé, on s'aperçoit que non seulement la disposition des deux gènes est maintenue (cf. fig. 32), mais également le chevauchement (à chaque fois 4 paires de bases superposées, données non montrées). Néanmoins, cette conservation pourrait être juste le résultat du manque de temps pour des réarrangements génomiques après la divergence de ces organismes à partir de leur ancêtre commun (Dandekar *et al.* 1998). L'ordre des gènes ne serait substantiellement perturbé entre deux espèces que lorsque ces espèces sont suffisamment divergentes au niveau évolutif, ce qui se traduit généralement par un taux d'identité entre protéines orthologues inférieur à 50% (Huynen *et al.* 1998).

Si l'on observe maintenant les protéines orthologues de YheI et YheH chez d'autres espèces bactériennes (cf. tableau 10), on constate plusieurs points :

1. le couple YheI/YheH est conservé chez des bactéries Gram + mais aussi Gram -, y compris des bactéries pathogènes ;
2. YheI est légèrement plus conservé que YheH (avec des taux d'identité 2-4% plus élevés), cela est également valable chez les différentes espèces de *Bacillus* (données non montrées) ;
3. l'ordre des gènes est maintenu, même si le taux d'identité atteint un maximum de 40% ;
4. le chevauchement génique est conservé, mais le nombre exact de paires de bases superposées est variable.

**Figure 32. Alignement des régions génomiques de différentes espèces de *Bacillus* contenant les orthologues de *yheI/yheH* (désignés ici Bsu0971/Bsu0972). Les gènes correspondants à *yheI* sont dessinés en noir. Alignement réalisé sur le site *Comprehensive Microbial Resource* (<http://cmr.tigr.org> ; Peterson *et al.* 2001). Il est à noter que l'orthologue de *yheH* chez *B. anthracis* est divisé en deux gènes qui codent séparément pour le domaine transmembranaire et le domaine nucléotidique. Cela ne relève vraisemblablement pas d'une erreur de séquençage, car une dizaine de génomes de différentes souches de *B. anthracis* ont été séquencées et cette particularité est commune à toutes. Probablement s'agit-il d'une mutation survenue dans l'évolution de *B. anthracis* après sa divergence de l'ancêtre commun. En accord avec cette hypothèse, des études phylogénétiques suggèrent que *B. anthracis* a divergé récemment de *B. cereus* et *B. thuringiensis* et représente une lignée génétique distincte (Anderson *et al.* 2005).**



**Tableau 10. Orthologues de *YheI/YheH* dans différentes bactéries.** <sup>a</sup>Pourcentage de résidus identiques plus très similaires, obtenu à partir d'alignements binaires réalisés avec l'algorithme ClustalW en utilisant les paramètres prédéfinis sur le serveur *Network Protein Sequence Analysis* (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/> ; Combet *et al.* 2000). <sup>b</sup> L'extension du chevauchement entre les deux gènes de chaque hétérodimère (putatif) est indiqué comme le nombre de paires de bases partagées par les deux séquences en incluant les codons d'initiation et stop.

	organisme	sous-unité	identité + similitude (%) <sup>a</sup>		chevauchement (paires de bases) <sup>b</sup>
			YheI	YheH	
Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>	YheI	-	48.2	4
		YheH	48.2	-	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	EF1733	70.8	49.9	1
		EF1732	55.4	59.2	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Lmo1652	69.5	49.0	17
		Lmo1651	53.6	60.3	
Gram -	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	SP1840	69.2	51.0	11
		SP1839	55.7	60.4	
	<i>Serratia marcescens</i>	SmdA	65.4	49.3	8
		SmdB	45.8	54.9	
	<i>Escherichia coli</i>	MdIA	63.7	44.9	8
		MdIB	49.4	54.8	

Une étude comparative de neuf génomes bactériens suggère que la conservation de l'ordre des gènes au sein d'un opéron (non seulement la conservation de l'opéron lui-même), est un fort indice d'une interaction entre les protéines concernées (Dandekar *et al.* 1998). A travers un phénomène co-évolutif, les recombinaisons géniques seraient réduites pour éviter la perturbation de paires de gènes co-adaptés.

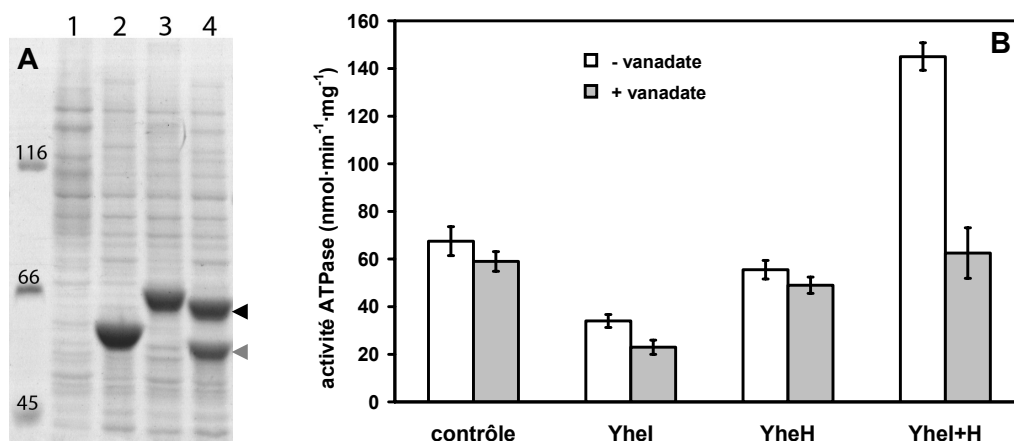
On pourrait argumenter qu'une régulation concertée maintiendrait la proximité des gènes au cours de l'évolution, mais la régulation concertée ne constitue pas apparemment une pression suffisante pour la conservation des opérons, les séquences régulatrices évolueraient trop rapidement (Huynen *et al.* 1998). Ainsi, l'organisation conservée de l'opéron *yhel/yheH* suggère fortement que les deux protéines interagissent ensemble, ce qui renforce l'hypothèse avancée par Quentin *et al.* (1999) que Yhel/YheH formeraient un transporteur hétérodimérique.

### *Expression hétérologue de Yhel et YheH chez E. coli*

Les gènes *yhel* et *yheH* sont vraisemblablement cotranscrits chez *B. subtilis*, comme suggéré par le chevauchement entre eux, dans la mesure où de nombreuses études de transcriptome réalisées sur cette bactérie trouvent une réponse concertée des deux gènes (cf. fig. 17). Dans ce travail, nous avons exploré la possibilité du couplage traductionnel de *yhel* et *yheH*. L'opéron *yhel/yheH* entre les codons *start* de *yhel* et *stop* de *yheH* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de *B. subtilis* et cloné dans un vecteur de type pET sous le contrôle d'un promoteur T7<sub>lac</sub>, inductible à l'IPTG (cf. Matériels et Méthodes). Quand *E. coli* BL21(DE3) est transformée avec ce plasmide, l'ajout d'IPTG induit la production stœchiométrique des protéines Yhel et YheH à partir du promoteur en amont de *yhel* (cf. fig. 33A). Ces résultats montrent que la disposition des gènes *yhel/yheH* permet chez *E. coli* la synthèse d'un ARNm polycistronique et vraisemblablement la traduction couplée des deux cadres de lecture, étant donnée la stœchiométrie apparente 1:1 des protéines produites. De la même manière, leur traduction devrait également être couplée chez *B. subtilis*, puisque les consensus pour le RBS et les autres séquences importantes pour la traduction sont largement partagés avec *E. coli* (Ma *et al.* 2002).

Les deux sous-unités du transporteur ABC SmdA/SmdB, homologue de Yhel/YheH chez *S. marcescens* (cf. tableau 10), ont été exprimées chez *E. coli* à partir de leur propre promoteur, situé en 5' de *smdA* (Matsuo *et al.* 2008). En revanche, dans le cas du transporteur EfrA/EfrB d'*E. faecalis*, dont l'identité avec Yhel/YheH n'est plus que de 26% et 28%, respectivement, chacun des gènes *efrA* et *efrB* possède un promoteur propre (Lee *et al.* 2003). L'homologue d'EfrA/EfrB chez *Lactococcus lactis*, LmrC/LmrD, a été exprimé chez *L. lactis* en tandem sous le contrôle d'un promoteur inductible par la nisine, le rendement obtenu étant notablement moins important pour la deuxième protéine (Lubelski *et al.* 2004). Ceci suggère que le couplage traductionnel de *lmrC/lmrD* ne fonctionne pas de manière efficace, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que ces gènes ne soient pas chevauchants. De manière intéressante, il a été montré que les gènes *drvA/drrB* de *Streptomyces peucetius* (cf. tableau 2) font preuve d'un couplage traductionnel robuste quand exprimés chez *E. coli* (Kaur *et al.* 1998), mais le couplage entre *drvA/drrB* de *M. tuberculosis*, qui présentent le même chevauchement, s'est révélé beaucoup plus faible (Choudhuri *et al.* 2002), et ces auteurs ont adopté la stratégie d'incorporer un deuxième RBS devant le gène *drrB* afin d'améliorer son taux d'expression.

**Figure 33. A : Vésicules de membrane inversées (IMVs) obtenues à partir d' *E. coli* BL21(DE3) surexprimant YheI et/ou YheH.** Gel à 10% acrylamide coloré au bleu de Coomassie avec 8 µg de protéines membranaires totales déposées dans chaque puits. 1: contrôle (vecteur pET21b vide); 2: T7-YheI-His<sub>6</sub> (pET21b/YheI); 3: T7-YheH-His<sub>6</sub> (pET21b/YheH); 4: T7-YheI + YheH-His<sub>6</sub> (pET21b/YheI-YheH). Marqueurs de poids moléculaire indiqués en kDa. Flèche noire: YheH (poids moléculaire attendu : 77 kDa), flèche grise: YheI (poids moléculaire attendu: 65 kDa). Les différences de mobilité électrophorétique observées pour YheI (piste 2 vs. 4) et pour YheH (piste 3 vs. 4) sont dues à la présence d'une étiquette additionnelle His<sub>6</sub> et T7, respectivement. **B : Activité ATPase des IMVs contenant YheI, YheH ou YheI+YheH.** Les vésicules contrôles ont été obtenues à partir de cellules d'*E. coli* transformées avec un plasmide pET21b vide. L'activité ATPase a été mesurée en dosant le phosphate libéré (cf. Matériels et Méthodes), en absence (blanc) ou présence (gris) de 200 µM ortho-vanadate. Les histogrammes correspondent à la valeur moyenne ± déviation standard de trois expériences.



En parallèle à l'expression conjointe de YheI et YheH, les deux protéines ont été produites séparément. Le rendement d'expression (et d'incorporation dans la membrane) est très important, que ce soit pour les protéines séparées ou pour les deux protéines ensemble (cf. fig. 33A), dépassant notamment le taux de protéine qui avait été obtenu dans la membrane pour le transporteur ABC BmrA (chiffree à ~50% des protéines membranaires totales ; Steinfels *et al.* 2002). Il est à noter également que l'expression indépendante de YheI ou YheH ne semble pas défavorisée, à l'encontre de ce qui a été décrit pour les transporteurs DrrA/DrrB (Kaur *et al.* 1998) et ABCG5/ABCG8 (Wang *et al.* 2006).

### *YheI et YheH forment « une ATPase » hétérodimérique*

Si les protéines YheI et YheH surexprimées dans la membrane d'*E. coli* sont fonctionnelles et vu le haut niveau d'expression atteint, leur activité ATPase devrait être mesurable au-dessus du bruit de fond dû aux autres ATPases présentes dans la membrane. Ainsi, nous avons mesuré l'activité ATPase des différentes membranes préparées (cf. fig. 33B) et constaté que, seulement en présence des deux protéines YheI et YheH, l'activité ATPase des membranes est plus élevée que pour le contrôle (membranes obtenues à partir de cellules transformées avec du plasmide vide). L'activité ATPase des membranes contrôle est notamment doublée quand YheI et YheH sont conjointement présentes dans la membrane. L'activité ATPase des membranes contenant séparément chacune des deux protéines est comparable au contrôle, voire plus basse, ce qui s'explique vraisemblablement par le fait que

pour une même quantité de membrane (en g de protéines totales) les ATPases membranaires endogènes sont plus représentées, étant donné l'absence de protéines surexprimées. Nos résultats suggèrent fortement que les protéines YheI et YheH constituent ensemble un transporteur ABC hétérodimérique, dont l'activité ATPase basale (en absence de substrat) peut être mesurée dans la fraction membranaire.

Cette affirmation est validée par l'observation que l'activité ATPase des membranes contenant YheI/YheH descend au niveau du contrôle en présence d'ortho-vanadate ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) (cf. fig. 33B). L'action inhibitrice de cet oxyanion métallique sur l'activité ATPase des transporteurs ABC est documentée depuis les premiers travaux sur la glycoprotéine-P (Ambudkar *et al.* 1992), ayant été ensuite mise en évidence sur de nombreux membres de la famille ABC (e.g. Decottignies *et al.* 1994; Davidson *et al.* 1996). L'ion vanadate  $\text{VO}_4^{3-}$  a une forte tendance à adopter une géométrie pentacoordonnée en acceptant un cinquième ligand. Cette propriété, alliée à sa parenté chimique avec l'ion phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ , lui permet de mimer l'état de transition des réactions de transfert de groupe phosphoryle et le rend un puissant inhibiteur de tyrosine phosphatases et de plusieurs ATPases, parmi les enzymes métabolisant le phosphate (Brautigan *et al.* 1988; Stankiewicz *et al.* 1995).

Ainsi, les demi-transporteurs YheI et YheH formeraient une unité fonctionnelle hétérodimérique, où les sites de liaison/hydrolyse de nucléotide vont se retrouver à l'interface formée entre le NBD de YheI et le NBD de YheH, et la liaison/translocation de substrat aurait lieu à l'interface entre le domaine transmembranaire de YheI et celui de YheH. Dans les conditions de notre étude (optimisées auparavant par C. Torres au laboratoire : *E. coli* BL21(DE3), milieu TurboBroth, induction à 25°C pendant 16 heures, cf. Matériels et Méthodes), le transporteur YheI/YheH s'exprime avec un rendement élevé et sous forme fonctionnelle (démonstré ici en ce qui concerne son activité ATPase, voir la section suivante pour l'activité de transport). Nos résultats montrent également que les sous-unités YheI et YheH isolées ne possèdent pas d'activité ATPase, cela pourrait signifier que ces protéines ne sont pas capables de former des homodimères ou que ces homodimères, s'ils existent dans la membrane, ne seraient pas actifs.

### *YheI et YheH interagissent physiquement*

Afin de confirmer ces indices sur un arrangement hétérodimérique de YheI et YheH, nous avons cherché à montrer une association physique entre les deux protéines. Pour cela, nous avons exploité le fait que, dans la construction utilisée pour l'expression chez *E. coli*, seul la sous-unité YheH porte une étiquette hexahistidine. Après avoir solubilisé les membranes contenant YheI/YheH, une étape de chromatographie d'affinité a été réalisée sur une résine de nickel-agarose. Après lavage, la fraction éluée de la colonne contient non seulement YheH, mais également YheI, qui ne porte pas d'étiquette hexahistidine (cf. fig. 42A). La coélution de YheI avec YheH-His<sub>6</sub> indique en effet une association physique entre les deux protéines. Une



copurification a été également mise en évidence pour les deux sous-unités des transporteurs ABC hétérodimériques LmrC/LmrD de *L. lactis* (Lubelski *et al.* 2004) et AbcA/AbcB de *Bifidobacterium breve* (Margolles *et al.* 2006), tous deux exprimés chez *L. lactis*, avec toutefois des taux d'expression inférieurs à celui atteint ici pour YheI/YheH chez *E. coli*.

La stœchiométrie entre YheI et YheH observée dans l'élution ne correspond pourtant pas à 1:1, comme attendu pour un hétérodimère. Ceci pourrait s'expliquer par une déstabilisation, lors de la purification, de l'association entre les sous-unités YheI et YheH, notamment par le détergent. Ainsi, une bande qui pourrait correspondre à YheI est visible dans la fraction non retenue (cf. fig. 42A). Dans le but d'obtenir une protéine purifiée active, la stabilité de l'interaction entre YheI et YheH est certainement un aspect important à contrôler, et nous reviendrons sur ce point par la suite.

## YHEI/YHEH : UN TRANSPORTEUR ABC DE MULTIPLES DROGUES

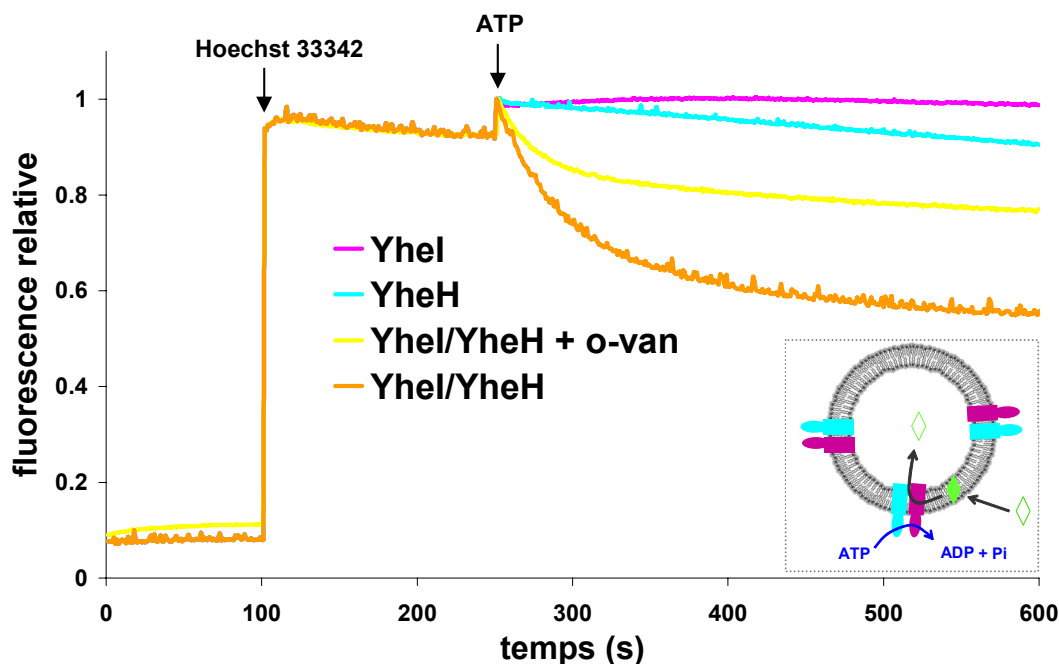
Une fois les conditions d'expression établies permettant d'obtenir un rendement élevé de Yhel/YheH sous forme active dans des vésicules de membrane inversées, nous avons abordé la question du substrat transporté par l'hétérodimère. Yhel/YheH a été classifié parmi les transporteurs putatifs de multiples drogues dans l'inventaire des protéines ABC réalisé par F. Denizot (Quentin *et al.* 1999) et nous avons cherché à valider cette hypothèse en identifiant le(s) substrat(s) transporté(s). Comme pour l'étude de Rv1747, nous nous sommes tournés vers des drogues hydrophobes ayant été décrites comme substrat d'autres transporteurs MDR et possédant des propriétés fluorescentes qui permettent le suivi de leur transport en temps réel par spectrofluorimétrie (cf. Matériels et Méthodes).

### *Mesures de transport dans des vésicules de membrane inversées (IMVs)*

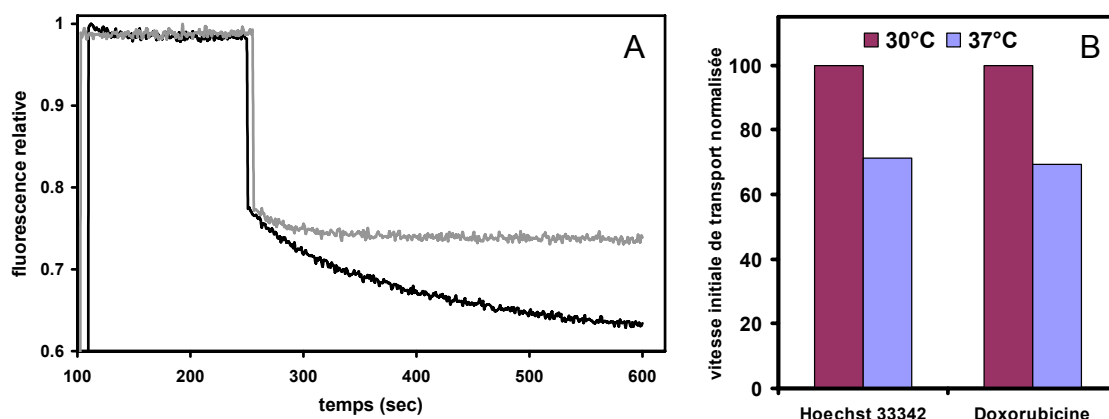
Comme le montre la figure 34, les IMVs contenant Yhel/YheH possèdent une activité significative de transport du Hoechst 33342 suite à l'ajout d'ATP. Cette activité est attribuable à l'hétérodimère Yhel/YheH, puisque les IMVs contenant une seule des deux protéines présentent une activité indétectable (Yhel) ou très faible (YheH). La légère diminution de fluorescence enregistrée pour les IMVs contenant YheH seul semblerait correspondre à une activité indépendante de l'ATP (et donc non attribuable à YheH), dans la mesure où une pente similaire est observée avant l'ajout d'ATP. L'ajout d'ortho-vanadate provoque une diminution importante de l'activité de transport du Hoechst 33342 par l'hétérodimère, ce qui confirme que l'activité de transport du Hoechst 33342 par Yhel/YheH est couplée à l'hydrolyse de l'ATP.

En plus du Hoechst 33342, d'autres drogues ont été identifiées pouvant être transportées par les IMVs contenant Yhel/YheH. Une activité significative de transport de la doxorubicine, un agent anticancéreux de la famille des anthracyclines (cf. Annexe A), a été observée (cf. fig. 35A), qui -comme pour le Hoechst 33342- est fortement abolie en présence de vanadate. De façon inattendue, nous n'avons pas pu mettre en évidence un transport de la daunorubicine, dont la seule différence avec la doxorubicine est la présence d'un groupement hydroxyle additionnel (cf. Annexe A). Il est possible que les propriétés fluorescentes ou de partition de la daunorubicine soient légèrement différentes, empêchant ainsi la détection du transport dans nos conditions.

**Figure 34. Transport du Hoechst 33342 par des vésicules de membrane inversées contenant YheI et/ou YheH.** Mêmes conditions que la fig. 30, avec 200  $\mu\text{g}$  de protéines membranaires totales ajoutées par mesure. La trace « + o-van » est obtenue en présence de 200  $\mu\text{M}$  vanadate ajouté à  $t = 0$ . Toutes les mesures ont été réalisées à 30°C.



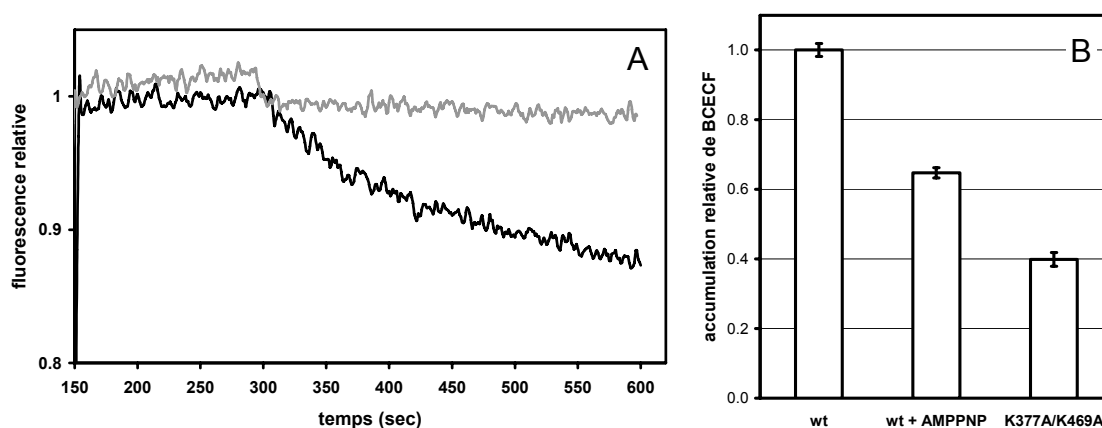
**Figure 35. A : Transport de la doxorubicine par des vésicules de membrane inversées contenant YheI/YheH en absence (tracé noir) ou présence (tracé gris) de 200  $\mu\text{M}$  vanadate.** Mêmes conditions que la fig. 34, avec 10  $\mu\text{M}$  doxorubicine ajoutés à  $t = 100$  s. **B : Effet de la température sur la vitesse de transport.** Les mesures décrites dans la figure 34 et 35A ont été effectuées à 30°C et à 37°C, et la vitesse initiale déterminée à partir des courbes normalisées en réalisant une régression linéaire sur un intervalle de 15 secondes après l'ajout d'ATP, d'après Shapiro *et al.* (1997a).



Par ailleurs, nous avons constaté que la vitesse apparente de transport, aussi bien du Hoechst 33342 que de la doxorubicine, est plus élevée à 30°C qu'à 37°C (cf. fig. 35B). Une observation similaire a été réalisée lors de l'étude du transport de la tétraméthylrosamine (TMR) dans des protéoliposomes contenant la glycoprotéine-P purifiée (Lu *et al.* 2001). Ces auteurs ont montré que le taux de transport de TMR par cette protéine dépend de l'état de phase des liposomes, le transport étant plus élevé dans la phase gel que dans la phase liquide-cristalline (alors que l'activité ATPase de la glycoprotéine-P dans les mêmes lipides est plus importante

quand ils sont dans la phase liquide-cristalline ; Romsicki *et al.* 1998). Ces résultats ont été interprétés dans le sens où la partition de la drogue TMR dans la bicouche serait l'étape limitant la vitesse du transport. Si cette interprétation est applicable à notre système de vésicules membranaires, cela pourrait indiquer une différence dans l'incorporation des drogues dans les IMVs d'*E. coli* entre 30°C et 37°C.

Le transport de deux autres composés a été mis en évidence pour le transporteur YheI/YheH (cf. fig. 36) : la mitoxantrone, une anthracènedione avec des propriétés anticancéreuses (cf. Annexe A), ainsi que la 2'-7'-bis(carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescéine (BCECF, cf. Annexe D). La fluorescence du BCECF ne présente pas de différence exploitable entre le milieu aqueux et membranaire, de telle sorte que l'accumulation de BCECF dans les IMVs a été mesurée en adaptant la méthode développée pour l'étude du transporteur MRP1 dans des « fantômes » d'érythrocyte (Wesolowska *et al.* 2005). Comme contrôle d'incorporation passive (ou indépendante de YheI/YheH) de BCECF, la mesure a été réalisée en présence d'AMPPNP, un analogue non hydrolysable de l'ATP (cf. fig. 36B). Afin de confirmer l'implication de YheI/YheH dans l'accumulation de BCECF observée, la lysine conservée du motif A de Walker a été remplacée par une alanine dans les deux sous-unités. Les IMVs contenant le double mutant accumulent significativement moins de BCECF qu'en présence de la protéine sauvage. La différence observée entre les deux contrôles (AMPPNP et double mutant YheI K377A/YheH K469A) pourrait s'expliquer en supposant que la liaison du nucléotide (sans hydrolyse) puisse aussi énergiser le transport du BCECF par YheI/YheH, ou alternativement par une contamination de l'AMPPNP par des traces d'ATP. D'autre part, une différence de perméabilité entre les deux préparations de membranes (contenant la protéine sauvage ou le double mutant) serait également concevable.



**Figure 36. A : Transport de la mitoxantrone par des vésicules de membrane inversées contenant YheI/YheH** en absence (tracé noir) ou présence (tracé gris) de 200  $\mu$ M vanadate. Mêmes conditions que la fig. 34, avec 500  $\mu$ g de protéines membranaires totales par mesure et 5  $\mu$ M doxorubicine ajoutés à  $t = 150$  s. **B : Accumulation de BCECF dans des IMVs contenant YheI/YheH.** Des IMVs (1 mg/ml de protéines membranaires totales) contenant YheI/YheH sauvage (wt) ou le double mutant YheI K377A/YheH K469A (K377A/K469A) ont été incubés à 30°C avec 12.5  $\mu$ M BCECF pendant 30 minutes en présence de 7 mM ATP ou 7 mM AMPPNP comme contrôle (wt + AMPPNP). Après des étapes de centrifugation et lavage, le culot des vésicules est resuspendu dans 1% Triton X-100 et l'accumulation de BCECF est estimée en quantifiant la fluorescence (cf. Matériels et Méthodes).

Nous avons ainsi montré que Yhel/YheH est capable de transporter au moins quatre drogues différentes (Hoechst 33342, doxorubicine, mitoxantrone, BCECF). Ces composés ont en commun leur nature hydrophobe et la présence dans leur structure chimique de cycles aromatiques et de charge(s) positive(s), propriétés partagées par de nombreux substrats des protéines MDR (Neyfakh 2002). Aucun trait plus précis ne semble ressortir de la comparaison des quatre drogues identifiées, qui permettrait de définir ou de restreindre la « spécificité » de substrat du transporteur Yhel/YheH. D'autres substrats caractéristiques des transporteurs MDR, tels que la rhodamine ou la 7-amino-actinomycine (cf. Annexe D), n'ont pas permis de mesurer une activité de transport dans les conditions employées dans cette étude.

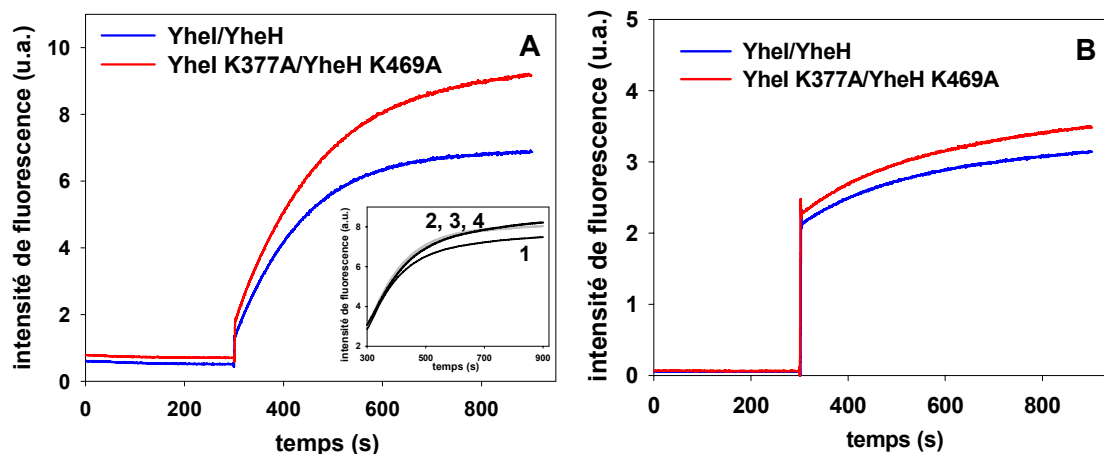
### Mesures de transport dans des cellules

Afin de vérifier si l'activité de transport observée dans les IMVs a lieu également dans un contexte cellulaire, nous avons mesuré l'incorporation du Hoechst 33342 et du bromure d'éthidium dans *B. subtilis*. La fluorescence de ces deux drogues augmente fortement suite à leur intercalation dans l'ADN, propriété qui est exploitée pour mesurer leur incorporation dans les cellules. Un taux augmenté d'incorporation d'éthidium a été observé dans *B. subtilis*  $\Delta bmrA$  (Steinfels *et al.* 2004), suggérant que ce transporteur est capable d'extraire l'éthidium des cellules dans la souche sauvage. En plus de cette drogue, nous nous sommes focalisés dans cette étude sur le Hoechst 33342, le substrat dont un transport plus important est observé dans les IMVs contenant Yhel/YheH.

Contrairement aux résultats obtenus pour BmrA, aucune différence n'a été mesurée dans l'accumulation d'éthidium et de Hoechst 33342 entre *B. subtilis* sauvage et  $\Delta yhel/yheH$  (résultats non montrés). Il est possible que l'expression de Yhel/YheH ne soit pas suffisamment élevée pour distinguer son activité parmi l'ensemble de transporteurs de drogues présents chez *B. subtilis*. A côté du transporteur ABC BmrA, au moins 5 transporteurs secondaires de *B. subtilis* sont notamment capables d'effluer l'éthidium (cf. tableau 5). C'est pourquoi nous avons décidé de réaliser des mesures d'accumulation dans des cellules d'*E. coli* KAM32 surexprimant Yhel/YheH à partir d'un plasmide multicopie (pUC18). Les pompes à efflux AcrAB (famille RND) et YdhE (famille MATE), deux des transporteurs majeurs de multiples drogues d'*E. coli* (Nishino *et al.* 2001), ont été délétées de la souche KAM32 pour son utilisation dans la caractérisation de nouveaux transporteurs MDR (Chen *et al.* 2002).

Les résultats obtenus dans la souche KAM32 sont illustrés dans la figure 37. L'accumulation d'éthidium et de Hoechst 33342 en présence du double mutant Yhel K377A/YheH K469A est plus importante qu'en présence de la protéine sauvage, indiquant que le transporteur Yhel/YheH serait capable d'effluer ces drogues quand exprimé chez *E. coli*. La réserpine, qui est un inhibiteur de la glycoprotéine-P (Beck *et al.* 1988), a été ajouté comme contrôle supplémentaire (cf. fig. 37 encadré), résultant en un niveau d'accumulation de Hoechst 33342 identique pour la protéine sauvage et le double mutant.

**Figure 37. Incorporation de Hoechst 33342 (A) et d'éthidium (B) dans *E. coli* KAM32 exprimant Yhel/YheH sauvage ou le double mutant Yhel K377A/YheH K469A.** 1  $\mu$ M Hoechst 33342 (A) ou 25  $\mu$ M bromure d'éthidium (B) ont été ajoutés après incubation des cellules avec 20 mM glucose pendant 5 minutes à 37°C (cf. Matériels et Méthodes). Des résultats comparables ont été obtenus à 30°C. Encadré : effet de la réserpine sur l'accumulation du Hoechst 33342. 30  $\mu$ M réserpine (tracés gris, 3 et 4) ou DMSO comme contrôle (tracés noir, 1 et 2) ont été ajoutés à  $t = 0$  aux cellules exprimant Yhel/YheH sauvage (1,3) ou Yhel K377A/YheH K469A (2,4). Les tracés correspondant à la protéine sauvage et double mutant en présence de réserpine (3 et 4) se superposent. L'intensité de fluorescence est indiquée en unités arbitraires (u.a.).



Il faut néanmoins signaler que ce type de mesures fait face à une variabilité expérimentale importante, résultant en des niveaux d'accumulation peu reproductibles. Cette variabilité non négligeable est vraisemblablement liée à l'état des cellules après culture et centrifugation. Le seul critère de normalisation utilisé est en fait la densité bactérienne, la viabilité des cellules n'étant pas vérifiée. Un autre facteur qui n'a pas été examiné ici est le degré d'expression de Yhel/YheH (sauvage ou muté), qui peut certes être variable d'une mesure à l'autre. Malgré ces difficultés, cette méthode a été utilisée de façon qualitative pour l'étude de plusieurs transporteurs MDR (e.g. Morita *et al.* 2000 et d'autres travaux de T. Tsuchiya ; Reuter *et al.* 2003; Mazurkiewicz *et al.* 2004).

## QUELLE FONCTION PHYSIOLOGIQUE POUR YHEI/YHEH ?

Nous avons montré que YheI/YheH fonctionne en tant que transporteur de multiples drogues, activité mise en évidence après surexpression chez *E. coli*. La question se pose maintenant sur son rôle physiologique : l'efflux de xénobiotiques est-il sa fonction majeure chez *B. subtilis* ? L'examen des orthologues de YheI/YheH chez d'autres espèces bactériennes (dont quelques-uns sont listés dans le tableau 10) nous procure une information limitée, leur fonction physiologique étant essentiellement inconnue. L'implication dans un phénotype MDR a été démontrée dans le cas de SmdA/SmdB de la bactérie Gram - *Serratia marcescens*, ce transporteur étant notamment capable de conférer une résistance à différents antibiotiques et drogues (norfloxacine, tétracycline, DAPI, Hoechst 33342) quand exprimé dans la souche KAM32 d'*E. coli*. Dans la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes*, l'expression de l'orthologue de *yheI/yheH* (*lmo1652/lmo1651*) est sous le contrôle du régulateur transcriptionnel CodY, qui semble réguler des gènes impliqués dans la virulence de la bactérie (Bennett *et al.* 2007). Par ailleurs, l'inactivation de l'orthologue de *yheI* (*lmo1652*) entraîne une réduction de la réplication intracellulaire de cette bactérie *in vivo* (Joseph *et al.* 2006). Dans le cas d'*Enterococcus faecalis*, une étude de transcriptome montre que l'orthologue de *yheI/yheH* (*ef1733/ef1732*) est surexprimé quand la bactérie est exposée au chloramphénicol et à l'érythromycine (Aakra *et al.* 2005).

### *YheI/YheH et les antibiotiques*

Comme son orthologue chez *E. faecalis*, la transcription de *yheI/yheH* chez *Bacillus subtilis* peut être modulée par la présence d'antibiotiques. Plusieurs études ont abordé la réponse transcriptionnelle de *B. subtilis* face à l'exposition à des concentrations subinhibitrices de différents antibiotiques, et trouvé de façon systématique une induction de *yheI/yheH* en présence d'une diversité importante de composés (au total plus d'une trentaine d'antibiotiques différents, cf. tableau 11). Le groupe de C. Freiberg (Urban *et al.* 2007) a montré que la région 5' non traduite de *yheI* est probablement responsable de cette réponse transcriptionnelle, en construisant une souche rapportrice où le gène de la luciférase a été mis sous le contrôle de cette région (paires de bases -500/-15 par rapport au codon d'initiation de *yheI*). En utilisant la région 5' non traduite de *yheH* dans une approche équivalente, aucune induction de la luciférase n'a pu être observée en présence d'antibiotiques (Hutter *et al.* 2004a). Ceci est en accord avec l'hypothèse de *yheI/yheH* étant transcrits dans un ARN messager bicistronique sous le contrôle d'un même promoteur en 5' de *yheI*.

Étude Composé**	Hutter <i>et al.</i> 2004b µg/ml* effet <sup>a</sup>	Freiberg <i>et al.</i> 2006 µg/ml* effet <sup>a</sup>	Urban <i>et al.</i> 2007 µg/ml* effet <sup>a</sup>	famille ou mode d'action	composant ribosomique affecté
gentamicine		0.26 -	12.5 -	aminoglycoside	30S
kanamycine		1 +	12.5 -	aminoglycoside	30S
néomycine	1 -+		12.5 -	aminoglycoside	30S
spectinomycine	128 +		12.5 +	aminoglycoside	30S
streptomycine			12.5 -	aminoglycoside	30S
doxycycline		3 +		tétracyclines	30S
oxytétracycline			3.13 +	tétracyclines	30S
tétracycline	0.5 +			tétracyclines	30S
TAN 1057		0.048 +		dérivé de pyrimidine	50S
althiomyicine			1.56 +	inhib. peptidyl transférase	50S
chloramphénicol <sup>b</sup>	4 +	0.4 +	1.56 +	inhib. peptidyl transférase	50S
hygromycine A			12.5 +	inhib. peptidyl transférase	50S
pleuromutiline			1.56 +	inhib. peptidyl transférase	50S
sparsomycine			12.5 +	inhib. peptidyl transférase	50S
clindamycine	2 +			lincosamide	50S
azithromycine		2 +		macrolide	50S
clarithromycine	0.25 +			macrolide	50S
érythromycine	4 +			macrolide	50S
tylosine			1.56 +	macrolide	50S
amicétine			3.13 +	nucléoside	50S
bamicétine			6.25 +	nucléoside	50S
linézolide		0.5 +	12.5 +	oxazolidinone	50S
viridogriséine			3.13 +	streptogramine B	50S
mikamycine A			6.25 +	streptogramine A	50S
pristinamycine 1C			1.56 +	streptogramine B	50S
siomycine A			1.56 +	thiopeptide	50S
thiopeptine B			12.5 +	thiopeptide	50S
thiostrepton			12.5 +	thiopeptide	50S
céphalosporine P1			1.56 +	stéroïde	EF-G
acide fusidique	0.06 +	0.08 +	1.56 +	stéroïde	EF-G
acide helvolique			12.5 +	stéroïde	EF-G
A10255J			1.56 +	thiopeptide	EF-Tu?
pactamycine		0.03 -+		inhib. initiation de traduction	complexe ARNt/initiation
actinonine	32 -	32 -	12.5 -	inhib. peptide déformylase	
puromycine	64 -+	13.6 -	12.5 -	analogue d'acide aminé adénosylé	
cerulénine	4 -	3 +		inhibition FAB	
hexachlorophène	0.03 +			inhibition FAB	
rifampicine	0.008 -+	0.025 -		inhib. synthèse d'ARN	
acide nalidixique	8 +	25 -		inhibition topoisomérase	
trinactine			6.25 +	polynactine	
ferrimycine A			1.56 +	sidéromycine	?

**Tableau 11. Induction de la transcription de *yheI/yheH* in vivo par des concentrations subinhibitrices d'antibiotique.** Les études de Hutter *et al.* (2004b) et de Freiberg *et al.* (2006) comparent le transcriptome de *B. subtilis* en absence et en présence d'antibiotique. L'étude de Urban *et al.* (2007) emploie une souche rapportrice contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de *yheI* (~500 paires de bases de la région 5' non traduite). Le tableau a été composé à partir des données supplémentaires des références. \*Indiquées sont les concentrations minimales identifiées capables d'induire la transcription de *yheI/yheH* ou, alternativement, les concentrations maximales auxquelles aucun effet n'a été observé. \*\*Les structures chimiques de plusieurs de ces composés sont présentées dans les annexes A et B. <sup>a</sup>induction élevée (+) ou modérée (-+) de la transcription de *yheI/yheH* ; pas d'effet (-). <sup>b</sup>L'induction de *yheI/yheH* en présence de 0.2 µg/ml chloramphénicol a été observée également par Lin *et al.* (2005). FAB : biosynthèse d'acides gras ; EF : facteur d'élongation.



Le spectre d'antibiotiques capables de stimuler la transcription de *yhel/yheH* est très caractéristique : La plupart inhibent la synthèse protéique, et une grande majorité atteignent la sous-unité 50S du ribosome (cf. tableau 11). Cette spécificité dans le profil de réponse transcriptionnelle a conduit à proposer le promoteur de *yhel* (et *yheH*) comme rapporteur utilisable pour identifier de nouveaux antibiotiques susceptibles d'affecter la synthèse protéique (Urban *et al.* 2007).

L'induction de *yhel/yheH* par une telle diversité d'antibiotiques traduit-elle une capacité du transporteur à les exporter de la cellule, cette réponse transcriptionnelle s'inscrivant de cette manière dans un mécanisme de protection ? Le transporteur MDR Yhel/YheH est-il un exportateur d'antibiotiques *in vivo* ? L'induction transcriptionnelle d'un transporteur par des drogues est notamment interprétée comme un fort indice d'un rôle physiologique du transporteur dans la résistance à de multiples drogues (Neyfakh 1997). En revanche, une faible corrélation a été observée entre les gènes induits chez *E. coli* par des antibiotiques à des concentrations subinhibitrices et ceux dont l'inactivation provoque une hypersensibilité de la bactérie aux mêmes antibiotiques (Tamae *et al.* 2008).

Parmi les composés qui ont été identifiés dans ce travail de thèse comme substrats de Yhel/YheH, seuls la doxorubicine et le bromure d'éthidium ont été inclus dans les études de transcriptome (Hutter *et al.* 2004b), et aucune induction du transporteur n'a été observée en présence de ces composés. D'autre part, nous avons réalisé des expériences de compétition pour étudier l'effet du chloramphénicol sur le transport du Hoechst 33342 par Yhel/YheH dans des IMVs. Dans les conditions utilisées ici, l'ajout de chloramphénicol n'a entraîné aucune modification du transport du Hoechst 33342, suggérant que le chloramphénicol, qui est un inducteur robuste de *yhel/yheH* (d'après 4 études différentes, cf. tableau 11), ne serait pas substrat du transporteur. Ceci étant, le chloramphénicol et le Hoechst 33342 pourraient se fixer sur deux sites différents du transporteur, comme observé pour la liaison de la rhodamine 123 et du Hoechst 33342 par la glycoprotéine-P (Shapiro *et al.* 1997b). Dans ce cas, plusieurs interactions seraient possibles entre les deux composés, depuis une fixation compétitive jusqu'à une interaction coopérative, rendant plus difficile l'interprétation de ce type de mesures.

Afin de mieux cerner le rapport entre induction transcriptionnelle et transport, des mesures de croissance en présence de différents antibiotiques ont été réalisées, dans le but de vérifier si Yhel/YheH est capable de protéger la cellule face aux antibiotiques qui induisent sa synthèse. Comme montré dans le tableau 12, aucune différence significative n'est observée entre *B. subtilis* sauvage et  $\Delta yhel/yheH$  concernant la sensibilité à sept antibiotiques différents, dont tous sauf la moxifloxacine sont capables d'induire l'expression de *yhel/yheH* à des concentrations subinhibitrices (cf. tableau 11). Ce résultat semble indiquer que, si Yhel/YheH est en effet capable d'exporter des antibiotiques, cette activité n'est pas essentielle à la résistance de *B. subtilis* dans les conditions utilisées dans notre étude, d'autres pompes à efflux étant probablement des acteurs majeurs de la protection de cette bactérie face à ces antibiotiques.

**Tableau 12. Sensibilité de *B. subtilis* et *E. coli* à différents antibiotiques en présence et absence de Yhel/YheH.** Les mesures ont été réalisées par notre collaborateur C. Freiberg (Karlsruhe, Allemagne) selon la méthode de dilution en milieu liquide (cf. Matériels et Méthodes). Des cultures incubées à 37°C pendant une nuit sont diluées jusqu'à une DO<sub>600nm</sub> de 0,001 et ensuite diluées 2-fois dans des puits d'une microplaque contenant des solutions d'antibiotique à différentes concentrations. Après incubation de la microplaque à 37°C pendant 18 heures, la concentration minimale d'antibiotique (en µg/ml) à laquelle aucune croissance bactérienne n'est observée (MIC pour *Minimal Inhibitory Concentration*) est déterminée et indiquée dans le tableau. Une différence de sensibilité est considérée comme significative si les valeurs obtenues pour les MIC diffèrent au moins d'un facteur 4 (en gras). La souche KZM120 d'*E. coli* est un mutant dérivé de la souche K-12, délété d'*acrAB* (Ma *et al.* 1995). 100 µg/ml IPTG ont été ajoutés quand signalé pour induire la transcription de *yhel/yheH* à partir du promoteur P<sub>lac</sub> du plasmide pUC18. D'autres mesures de sensibilité ont été réalisées par la méthode de diffusion en milieu solide (cf. Matériels et Méthodes), qui n'ont pas révélé des différences significatives attribuables à Yhel/YheH.

Antibiotique	<i>Escherichia coli</i> KZM120 ( $\Delta$ acrAB)				<i>Bacillus subtilis</i>	
	Yhel/YheH sauvage		Yhel K377A/YheH K469A		sauvage	$\Delta$ yhel/yheH
	- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+ IPTG		
chloramphénicol	2	2	1	1	4	4
doxorubicine	8	4	8	8	2-4	2
doxycycline	0,25	<b>0,5</b>	0,125	0,125	0.5	0.5
érythromycine					0.125	0.125
acide fusidique	<b>&gt;64</b>	<b>&gt;64</b>	32	32	1	0.5
linézolide					0.5	0.5
moxifloxacine	0,003	0,003	0,003	0,003	<0.03	<0.03
novobiocine	2	2	4	4		

concentrations minimales inhibitrices (MIC) en µg/ml

Quand les mesures de sensibilité sont réalisées sur des souches d'*E. coli* où les gènes du transporteur MDR AcrAB sont délétés et qui expriment Yhel/YheH, une faible protection apparaît vis-à-vis de la doxycycline et l'acide fusidique (cf. tableau 12). Il est possible que la surexpression de Yhel/YheH chez *E. coli* à partir du plasmide pUC18 utilisé atteigne des quantités de protéine plus importantes que dans *B. subtilis* malgré l'induction des gènes *yhel/yheH* par les antibiotiques dans cette bactérie. De plus, l'efflux d'antibiotiques « basal » chez *E. coli* en absence du transporteur AcrAB pourrait être plus réduite que dans *B. subtilis*, de telle sorte qu'il soit possible de détecter une protection conférée à *E. coli* par Yhel/YheH.

Ces résultats peuvent être interprétés dans le sens où Yhel/YheH serait capable d'effluer des antibiotiques *in vivo*, sans que cette activité soit suffisamment importante pour rendre *B. subtilis* résistante, au moins dans les conditions de cette étude et en ce qui concerne les antibiotiques abordés. Cette observation serait en accord avec la constatation faite sur plusieurs bactéries, où seulement une faible proportion des transporteurs MDR putatifs serait en effet capable de conférer une résistance aux antibiotiques. Ainsi, 4 des 30 pompes à efflux putatives d'*E. faecalis* seraient impliquées dans la résistance aux antibiotiques (Davis *et al.* 2001) et 20 sur 37 transporteurs MDR putatifs d'*E. coli* pourraient rendre cette bactérie résistante quand surexprimés à partir d'un plasmide (Nishino *et al.* 2001). La différence dans la proportion de MDR « réels » obtenue pour ces deux bactéries (13% pour *E. faecalis*, 54% pour *E. coli*) pourrait être due aux approches expérimentales utilisées. En effet, les gènes MDR ont été délétés dans l'étude portant sur *E. faecalis*, tandis que les transporteurs ont été surexprimés dans le travail sur *E. coli*. Ainsi, une étude récente d'invalidation génique systématique chez *E.*

*coli* n'identifie qu'un transporteur MDR putatif (AcrAB-TolC) impliqué effectivement dans la résistance d'*E. coli* aux différents antibiotiques utilisés (Tamae *et al.* 2008). Le fait que l'étude de Nishino *et al.* (2001) retrouve un nombre plus important de transporteurs MDR potentiels rejoint nos résultats sur Yhel/YheH, qui semblerait pouvoir conférer une résistance quand surexprimé à partir d'un plasmide multicopie (chez *E. coli*), à la différence de ce qui est observé chez *B. subtilis* portant un seul exemplaire des gènes (cf. tableau 12).

Contrairement à nos résultats sur Yhel/YheH, des transporteurs ABC hétérodimériques ont été identifiés comme déterminants majeurs de résistance chez *Lactococcus lactis* (LmrC/LmrD ; Lubelski *et al.* 2006a) et chez *Streptococcus pneumoniae* (SP2073/SP2075, nommé également PatA/PatB ; Robertson *et al.* 2005; Marrer *et al.* 2006; Garvey *et al.* 2008). Ces deux transporteurs ne sont pas des orthologues de Yhel/YheH, leur taux de similitude avec Yhel/YheH dépasse à peine 55%. L'orthologue de Yhel/YheH chez *S. pneumoniae* serait SP1840/SP1839, avec respectivement 69% et 60% de résidus conservés (cf. tableau 10), mais sa possible implication dans un phénotype MDR n'a pas été abordée dans l'étude réalisée sur des transporteurs MDR putatifs de cette bactérie (Robertson *et al.* 2005). Il convient également de noter que chez *B. subtilis* et d'autres bactéries présentes dans un biotope compétitif (tels que le sol), de nombreux transporteurs MDR putatifs sont présents (Paulsen *et al.* 2001), ce qui diminue vraisemblablement la probabilité d'identifier un seul transporteur comme déterminant majeur de résistance.

Si la signification biologique de la stimulation de *yhel/yheH* par les antibiotiques demeure une question ouverte, il en est de même du mécanisme responsable de cette induction. Un système de régulation de l'expression de transporteurs MDR qui a été extensivement étudié implique deux régulateurs transcriptionnels de *Saccharomyces cerevisiae* : Pdr1 et Pdr3<sup>18</sup>. Ces deux facteurs de transcription, portant des motifs en doigt de zinc et capables de lier des xénobiotiques (Thakur *et al.* 2008a), activent l'expression d'une vingtaine de gènes, dont au moins cinq transporteurs MDR : trois transporteurs ABC (Pdr5, Yor1, SNQ2) et deux transporteurs MFS (Monk *et al.* 2008), via la reconnaissance de séquences spécifiques dans leurs promoteurs qui ont été appelées PDRE pour *Pdr1/Pdr3 Response Element* (Katzmann *et al.* 1996). Chez les bactéries, au moins quatre familles de régulateurs transcriptionnels (AraC, MarR, MerR et TetR) sont capables de moduler l'expression de transporteurs MDR des familles MFS et RND (Grkovic *et al.* 2002). QacR et BmrR, qui appartiennent aux familles TetR et MerR respectivement, ont été mentionnés précédemment (cf. « La reconnaissance de multiples drogues dévoilée ? »). Chez *Lactococcus lactis*, un régulateur transcriptionnel appelé LmrR et apparenté à la famille MerR, semble contrôler l'expression du transporteur ABC LmrC/LmrD (Agustiandari *et al.* 2008). Le gène *lmrR* précède ceux de *lmrC/lmrD* dans le génome.

<sup>18</sup> Chez la levure, le terme PDR (*Pleiotropic Drug Resistance*) est utilisé en parallèle à MDR (Balzi *et al.* 1991).

Aucun gène régulateur n'est identifiable dans la région génomique autour de *yheI/yheH*. Un cadre de lecture putatif nommé *yheJ* précède le gène *yheI* (avec un espacement de 120 nucléotides entre les deux gènes, cf. fig. 38). *yheJ* code une protéine de 53 acides aminés, qui ne montre aucune similitude avec des protéines de fonction connue et n'est pas conservée (cf. fig. 32). Les études de transcriptome réalisées chez *B. subtilis* montrent que l'expression de *yheJ* n'est pas corrélée avec celle de la paire *yheI/yheH*, i.e. l'expression de *yheJ* n'est pas augmentée comme celle de *yheI/yheH* en réponse aux antibiotiques ou à d'autres types de stress, comme discuté précédemment (cf. fig. 17), ce qui suggère que *yheJ* ne ferait pas partie de l'opéron. Une recherche de promoteurs putatifs révèle dans la région 5' de *yheI* la présence d'une séquence promoteur correspondant parfaitement au consensus du facteur  $\sigma^A$  (cf. fig. 38). Ce promoteur est prédit comme le plus probable par un algorithme d'identification de promoteurs<sup>19</sup>. Ce promoteur précède le gène *yheJ*, ce qui semblerait, en revanche, en faveur de l'hypothèse d'un opéron *yheJ/yheI/yheH*.

Le facteur  $\sigma$  est la sous-unité de l'ARN polymérase qui dicte la reconnaissance des promoteurs. Le facteur  $\sigma^A$  est le facteur sigma primaire de *B. subtilis*, responsable majeur de l'activité de transcription des cellules en phase de croissance rapide. Mais en fonction des conditions (e.g. lors des transitions de croissance, des stress divers ou d'une différenciation morphologique) d'autres facteurs  $\sigma$  viennent prendre la place de  $\sigma^A$  (Helmann 2002). Il est donc possible que la transcription des gènes *yheI/yheH* induite par les antibiotiques soit médiée par un facteur  $\sigma$  autre que  $\sigma^A$ , qui reconnaîtrait un promoteur différent potentiellement situé entre les gènes *yheJ* et *yheI* et résulterait en la transcription de *yheI* et *yheH* (et non pas de *yheJ*).

### *L'atténuation transcriptionnelle : implication des antibiotiques ?*

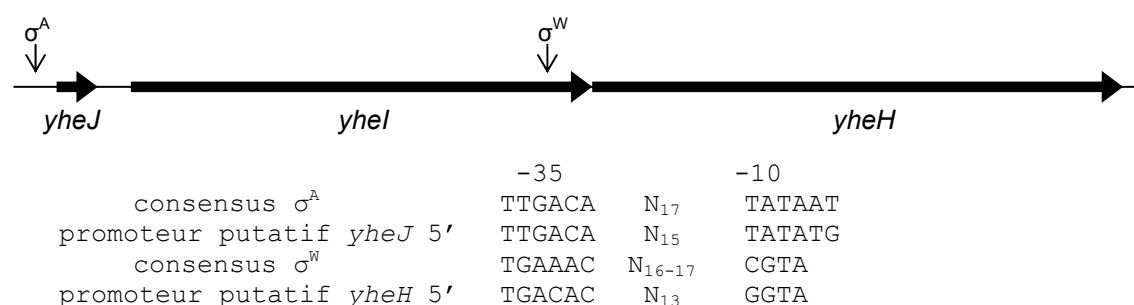
La régulation par atténuation (ou terminaison-antiterminaison) implique une réponse cellulaire à un signal, consistant soit en l'arrêt ou en la reprise de la transcription par l'ARN polymérase. Dans la version élémentaire, le mécanisme d'atténuation est médié par le terminateur et l'antiterminateur, des structures secondaires en forme d'épingle dans l'ARN messager naissant. Les séquences impliquées dans ces structures secondaires sont partiellement chevauchantes, de manière à ce que la formation du terminateur et celle de l'antiterminateur s'excluent mutuellement. Différentes possibilités existent pour réguler la formation de l'une ou l'autre structure. L'atténuation de la transcription médiée par le ribosome (dans un mécanisme de transcription et traduction couplées) est le mode de régulation le mieux compris, notamment dans le cadre de l'opéron *trp* de biosynthèse du tryptophane chez *E. coli* (Yanofsky 2001). Au début de la transcription, une épingle dans l'ARN messager naissant appelée « pause » bloque l'avancement de l'ARN polymérase, ce qui laisse le temps au ribosome d'initier la traduction de ce messenger (cf. fig. 39). Celui-ci contient plusieurs codons correspondants au tryptophane, de tel sorte que le ribosome reste bloqué dans des conditions

<sup>19</sup> [www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)

limitantes de tryptophane. Ainsi, une structure d'antiterminaison en 3' se forme qui rivalise avec le terminateur et permet alors la transcription des gènes structuraux pour la synthèse du tryptophane. En excès de tryptophane, le ribosome continue la traduction et empêche la formation de l'antitermineur. Le terminateur se forme alors et bloque ainsi la transcription des gènes de synthèse du tryptophane par l'ARN polymérase, en accord avec la disponibilité de l'acide aminé.

Une étude systématique du génome de *B. subtilis* (Merino *et al.* 2002) a permis d'identifier des « atténuateurs » putatifs, i.e. des régions génomiques précédant un gène donné pouvant donner lieu à des terminateurs et des antitermineurs. Dans le cas de l'opéron *yheJ/yheH*, une telle région a été identifiée dans la région codante de *yheJ*, qui permet en plus la formation d'une troisième épingle de type « anti-anti-terminateur », rajoutant un degré additionnel de complexité (cf. fig. 40).

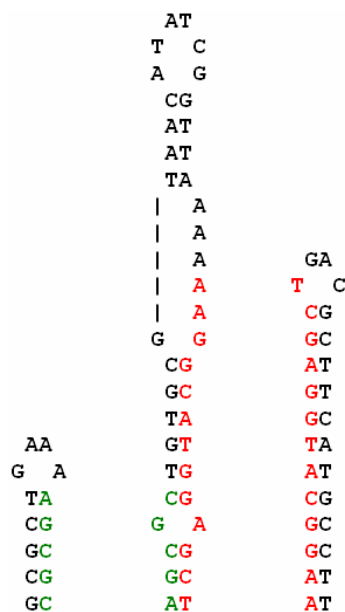
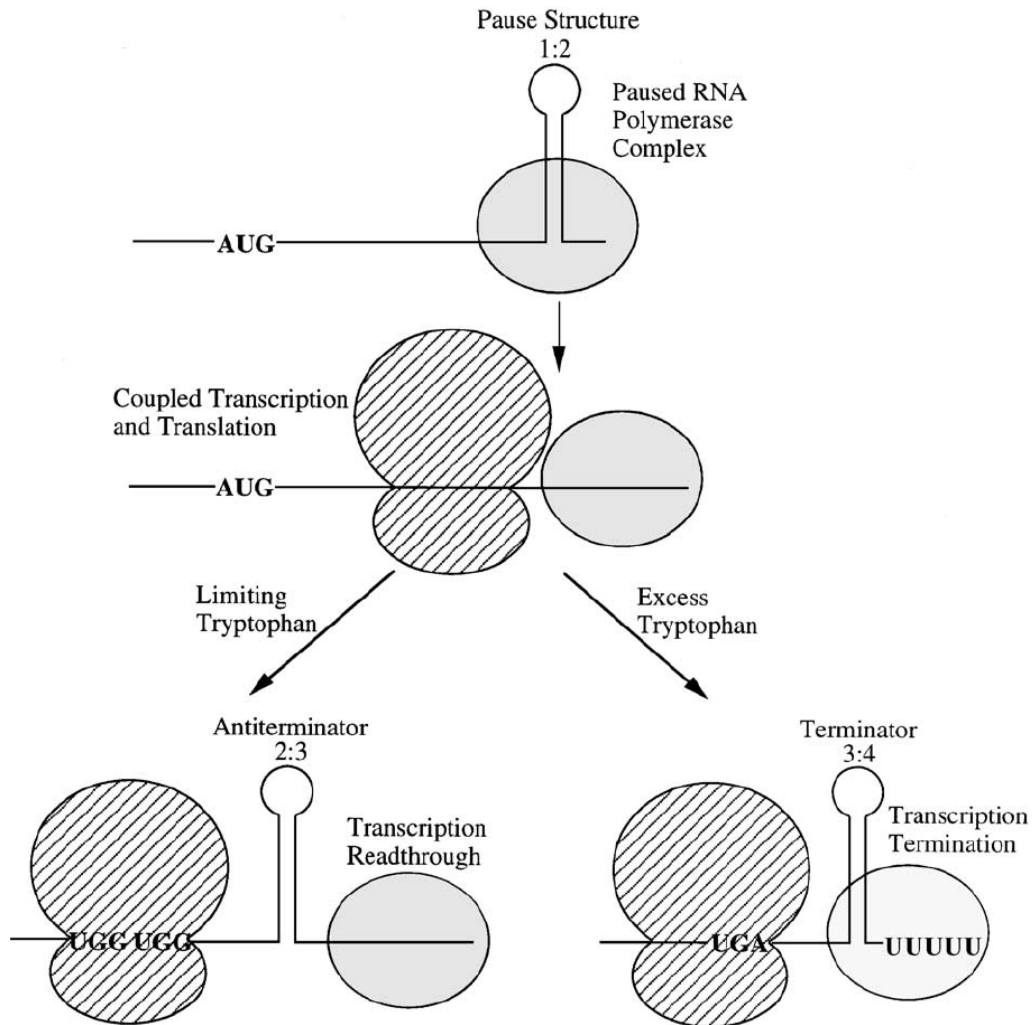
En supposant que le schéma de régulation de l'opéron *trp* soit applicable à *yheJ/yheH*, on peut émettre l'hypothèse que les antibiotiques pourraient exercer un rôle analogue aux codons Trp. L'ARN polymérase initierait la transcription à partir du promoteur  $\sigma^A$  (cf. fig. 38) et, de façon concomitante, le ribosome commencerait la traduction de *yheJ*. En absence d'antibiotiques, la transcription de *yheJ/yheH* par l'ARN polymérase serait bloquée par le terminateur et/ou l'anti-antitermineur, qui seraient favorisés par l'avancement du ribosome. En présence d'antibiotiques se liant au ribosome et bloquant son avancement, la formation de l'antitermineur serait favorisée permettant ainsi la transcription des gènes *yheJ/yheH* par l'ARN polymérase. Ce mécanisme purement spéculatif serait cohérent avec le fait que l'expression de *yheJ/yheH* est surtout stimulée par les antibiotiques ciblant le ribosome (cf. tableau 11).<sup>20</sup>



**Figure 38. Région génique de *B. subtilis* montrant l'emplacement de *yheJ* par rapport aux gènes *yheJ/yheH*, ainsi que la position des promoteurs putatifs de type  $\sigma^A$  et  $\sigma^W$ .** Echelle : ~287 paires de bases/cm. La séquence des promoteurs putatifs est également indiquée, avec les consensus tirés de Haldenwang (1995) pour  $\sigma^A$  et de Cao *et al.* (2002a) pour  $\sigma^W$ . N représente une base quelconque. Le début de transcription putatif de type  $\sigma^W$  obtient un score de 0.84 sur 1 sur le serveur de prédiction de promoteurs [www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Le promoteur de type  $\sigma^A$  obtient un score de 1.

<sup>20</sup> Ce modèle d'atténuation, qui est néanmoins basé sur un opéron tripartite *yheJ/yheJ/yheH*, expliquerait l'absence d'induction de *yheJ* observée dans les études de transcriptome: ce gène serait transcrit dans tous les cas, et seulement une partie des messagers continueraient jusqu'à la fin de *yheH*. Un rapport messagers *yheJ/yheJ/yheH*: messagers *yheJ* supérieur à 1 signifie notamment une induction de *yheJ/yheH*, mais non de *yheJ*.

**Figure 39. Régulation de l'opéron tryptophane par atténuation de la transcription.** La concentration cellulaire en tryptophane régule l'expression des gènes structuraux de l'opéron biosynthétique de l'acide aminé. Cf. texte pour l'explication du mécanisme. Image tirée de Gollnick *et al.* (2002).



**Figure 40. Structure d'atténuation de transcription prédite pour *yheI/yheH*.** Épingle gauche: anti-antiterminateur; épingle centrale: antiterminateur; épingle droite: terminateur. Les bases partagées par les structures d'**antiterminaison** et de **terminaison** sont présentées en **rouge**. Les bases partagées par les structures d'**anti-antiterminaison** et d'**antiterminaison** sont montrées en **vert**. Les régions codantes sont représentées par des majuscules, et les non-codantes en minuscules. Le codon de terminaison de *yheJ* et le codon d'initiation de *yheI* sont soulignés. Tiré de Merino *et al.* (2002) et de [http://cmgm.stanford.edu/~merino/Bacillus\\_subtilis/16078036.html](http://cmgm.stanford.edu/~merino/Bacillus_subtilis/16078036.html)

TTTTATATACAAAATCTAAggaagacaggtgtatgggatgtgaagacaaa  
 tacagagggcgagggcaggttcgtgcaaaactggatgaaaaaagctgcaaggaaaaaatagaaggcggctgatgagg  
 agatggggatagATG

La capacité des antibiotiques à moduler l'expression génique est un sujet d'étude de grande actualité. Il paraît de plus en plus évident que les effets des antibiotiques sur les cellules suivent un comportement d'hormèse<sup>21</sup> : A forte concentration, ils inhibent la croissance (ou tuent les bactéries), tandis qu'à des concentrations subinhibitrices, ils sont capables de moduler l'expression d'un nombre élevé de gènes (Davies *et al.* 2006). Ceci est vrai non seulement pour les antibiotiques ciblant le ribosome, mais également pour ceux inhibant la synthèse de la paroi cellulaire ou la synthèse d'acides nucléiques. De façon intéressante, les gènes contrôlés par les différents type d'antibiotiques ne sont pas forcément les mêmes. Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés antimicrobiens, d'importants efforts sont déployés pour identifier des groupes de gènes répondant spécifiquement à un type d'antibiotique donné. La détermination de la signature transcriptionnelle d'un antibiotique (ou d'un groupe d'antibiotiques avec un même mode d'action) permet notamment de cribler de nouveaux composés par des études de transcriptome (Fischer *et al.* 2007).

Comment les antibiotiques modulent-ils l'expression génique ? Peu de données sont disponibles aujourd'hui sur ce sujet. Il semblerait que la liaison spécifique à des facteurs de transcription peut difficilement expliquer l'effet pléiotropique induit par certains antibiotiques. Dans le cas qui nous concerne, la question qui se pose est comment un ribosome inhibé par l'antibiotique peut faire parvenir un signal à l'appareil transcriptionnel. L'atténuation transcriptionnelle médiée par le ribosome (cf. fig. 39) pourrait représenter un mécanisme possible. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant d'examiner la présence d'(anti)terminateurs en 5' des gènes qui sont régulés par ces antibiotiques.

Une explication alternative serait le déclenchement d'une voie de signalisation cellulaire spécifique à l'issue de l'inhibition ribosomique. Un modèle bien étudié de liaison entre la traduction et la transcription implique le nucléotide (p)ppGpp lors de la réponse stringente. Comme évoqué précédemment, l'arrêt ribosomique causé par la carence en acides aminés induit l'accumulation du (p)ppGpp et le déclenchement d'un programme transcriptionnel complexe (cf. fig. 15). Une étude de 1975 semble appuyer l'idée que la réponse transcriptionnelle induite par les antibiotiques ciblant le ribosome pourrait être médiée par le (p)ppGpp. Les auteurs ont notamment montré que le traitement de *B. subtilis* avec ce type d'antibiotiques induit une forte accumulation de (p)ppGpp; en revanche, des antibiotiques avec d'autres modes d'action, tels que l'inhibition de la synthèse d'acides nucléiques, ne donnent pas lieu à cette accumulation (Rhaese *et al.* 1975 ; cf. fig. 41).

<sup>21</sup> En toxicologie, l'hormèse est définie comme un phénomène de dose-réponse biphasique caractérisé par une stimulation à faible dose et une inhibition à forte dose. Ce terme est généralement employé pour désigner des réponses biologiques plutôt favorables que peuvent induire de faibles concentrations de toxines ou d'autres substances autrement nocives.

## *YheI/YheH et le stress cellulaire*

De façon intéressante, la stimulation de la transcription de *yheI/yheH* a été également observée lors de la réponse stringente de *B. subtilis* (cf. fig. 41 ; Eymann *et al.* 2002). *yheI/yheH* font partie d'un groupe de ~70 gènes, dont la modulation de l'expression lors de la réponse stringente serait néanmoins indépendante de RelA (l'enzyme responsable de la formation de (p)ppGpp). Ceci peut avoir différentes explications : (i) D'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle alternatifs à celui médié par le (p)ppGpp pourraient être déclenchés lors d'un défaut ribosomique. (ii) D'autres voies de synthèse de (p)ppGpp pourraient exister en plus de celle catalysée par RelA. Chez *B. subtilis*, RelA était considérée comme la seule enzyme capable de catalyser cette réaction, mais récemment deux autres synthétases de (p)ppGpp ont été identifiées, YwcA et YjbM (Nanamiya *et al.* 2008). (iii) L'induction de *yheI/yheH* serait provoquée non pas par le (p)ppGpp, mais par l'augmentation de la concentration en ATP. Lors de la réponse stringente, l'augmentation de (p)ppGpp résulte notamment en une diminution de la concentration de GTP et une augmentation de la concentration d'ATP et, comme discuté précédemment, les changements transcriptionnels qui s'opèrent lors de la réponse stringente peuvent être gouvernés par l'identité des positions +1 des ARN messagers. Les transcrits commençant par une adénine verraient leur transcription augmentée et, en revanche, la transcription démarrant en guanine serait réduite (Krasny *et al.* 2008). Le début de transcription prédit pour *yheI/yheH* (cf. fig. 38, promoteur  $\sigma^A$ ) commence par une adénine, et les quatre premières bases sont des adénines. L'induction de *yheI/yheH* lors de la réponse stringente pourrait ainsi résulter de l'augmentation de la concentration en ATP.

Un lien supplémentaire existe entre l'expression de *yheI/yheH* et l'état du ribosome en plus des observations faites sur les antibiotiques et la réponse stringente. Comme décrit dans la partie « Rappels bibliographiques », les gènes *yheI/yheH* sont notamment induits lors du défaut de maturation ribosomique induit par la déplétion de la GTPase RbgA (cf. fig. 41 ; Uicker *et al.* 2006). Cette observation serait cohérente avec le modèle d'atténuation transcriptionnelle médiée par le ribosome proposé précédemment comme mécanisme d'induction de *yheI/yheH*. D'un autre côté, l'induction de *yheI/yheH* en présence d'antibiotiques, lors de la réponse stringente et du défaut de maturation ribosomique suggère que le transporteur YheI/YheH pourrait intervenir dans une réponse cellulaire au stress (ribosomique ?) plutôt que dans l'efflux d'antibiotiques, ce qui serait en accord avec l'absence de phénotype observable du mutant *ΔyheI/yheH* concernant la résistance aux antibiotiques (cf. tableau 12).

Par ailleurs, comme discuté précédemment, l'expression de *yheH* est induite en réponse au stress alcalin dans un mécanisme dépendant du facteur  $\sigma^W$  (Wiegert *et al.* 2001). De façon surprenante, cette induction ne concernerait pas *yheI*, puisqu'aucune surexpression de ce gène n'a été détectée dans ce travail. La transcription de *yheH* pourrait-elle se faire indépendamment de celle de *yheI* à partir d'un promoteur exclusif ? L'analyse de la région 5' du



gène *yheH* permet d'identifier un promoteur proche d'un consensus proposé pour les gènes régulés par  $\sigma^W$  (Cao *et al.* 2002a ; cf. fig. 38). D'autre part, l'induction de *yheH* pourrait ne pas être directement médiée par  $\sigma^W$ , mais résulter d'une cascade de signalisation initiée par ce facteur sigma. Le promoteur de YwaC, enzyme récemment identifiée comme synthétase de (p)ppGpp, est reconnu par  $\sigma^W$ , au moins *in vitro* (Cao *et al.* 2002a). L'induction de cette enzyme a été observée *in vivo* en réponse au stress alcalin, entraînant une forte accumulation du nucléotide « signalisateur » (p)ppGpp (cf. fig. 41 ; Nanamiya *et al.* 2008). Il est donc possible que l'induction de *yheH* en réponse au stress alcalin dérive de la même cascade de signalisation induisant *yheI/yheH* lors de la réponse stringente. Néanmoins, il serait surprenant que l'expression de *yheH* ait lieu indépendamment de celle de *yheI*, car nos résultats suggèrent fortement que les protéines isolées ne seraient pas fonctionnelles. La surexpression isolée de *yheH* aurait du sens dans un scénario hypothétique où la protéine YheH pourrait former un hétérodimère fonctionnel avec un demi-transporteur autre que YheI.

Le facteur  $\sigma^W$  a par ailleurs été impliqué dans le stress affectant l'homéostasie de la paroi cellulaire. Il a même été proposé que l'induction du régulon  $\sigma^W$  observée lors du stress alcalin serait une conséquence de l'inhibition de la machinerie de synthèse de la paroi cellulaire, plutôt qu'une stratégie cellulaire pour faire face au stress alcalin. Cette hypothèse est renforcée par l'observation que la capacité de *B. subtilis* à survivre au stress alcalin n'est pas affectée par la délétion du gène  $\sigma^W$  (Cao *et al.* 2002b). Cette étude montre que le facteur  $\sigma^W$  et son régulon sont induits par des antibiotiques qui affectent la synthèse de la paroi cellulaire, alors qu'aucune induction de  $\sigma^W$  n'est observée en présence d'antibiotiques ciblant la synthèse protéique, y compris certains (chloramphénicol, spectinomycine et tétracycline) qui stimulent la transcription de *yheI/yheH* (cf. tableau 11). Ceci exclut que l'induction de *yheH* observée en présence d'antibiotiques soit dépendante de  $\sigma^W$ . Cependant, il est tout à fait possible que les deux voies de signalisation (antibiotiques et  $\sigma^W$ ) confluent dans une « branche » commune, telle que la réponse stringente, comme discuté précédemment (cf. fig. 41).

Quelle peut être la signification biologique de l'induction de *yheH* par  $\sigma^W$  ? Le régulon de  $\sigma^W$  semble avoir un rôle large dans la protection contre des bactériocines<sup>22</sup>, ainsi que dans la détoxification. Cette réponse ne concernerait pas seulement les antibiotiques affectant la paroi cellulaire : une estérase putative d'érythromycine (antibiotique macrolide ciblant le ribosome) est également sous le contrôle de  $\sigma^W$  (Cao *et al.* 2002a). Dans ce contexte, le contrôle de *yheH* par  $\sigma^W$  suggère un rôle du transporteur dans la détoxification cellulaire.

<sup>22</sup> Les bactériocines sont des composés de nature protéique synthétisés par des bactéries et sécrétés dans leur environnement, où elles sont létales pour les bactéries autres que la souche productrice.

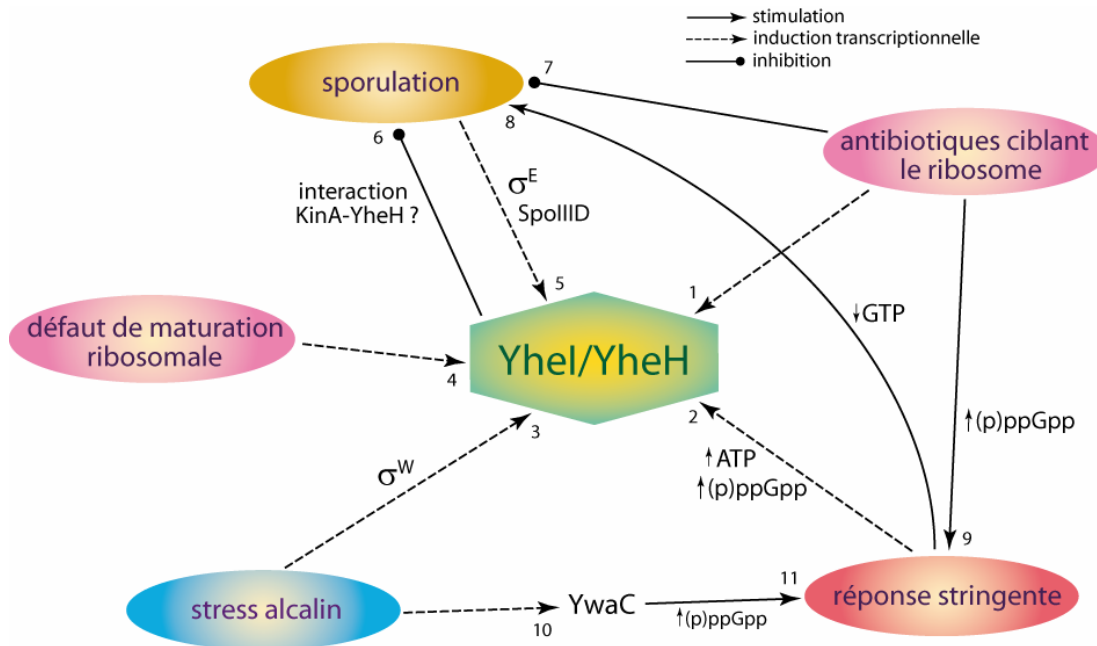
## *YheI/YheH et la sporulation*

Finalement, un rapport des protéines YheI/YheH avec la sporulation de *B. subtilis* a été suggéré par deux études différentes (cf. fig. 41; Eichenberger *et al.* 2004; Fukushima *et al.* 2006), décrites dans la partie « Rappels bibliographiques ». Ces deux travaux proposent une implication opposée du transporteur dans la sporulation, ayant lieu à deux moments très différents : la première étude suggère un rôle du transporteur au cours du programme de différenciation de la cellule mère après la septation asymétrique (*yheI/yheH* seraient exprimés environ 3½h après le début du processus de sporulation ; cf. fig. 12), alors que la seconde attribue à la surexpression de YheI/YheH un rôle inhibiteur qui s'effectuerait sur l'étape de « discernement » initial précédant le déclenchement de la sporulation. En utilisant la technique de double hybride, l'étude de Fukushima *et al.* (2006) met en évidence une interaction entre YheH et KinA, la kinase responsable avec KinB du transfert initial de phosphate dans la cascade de signalisation qui déclenche la sporulation (cf. fig. 14). De plus, ils observent une diminution de l'efficacité de sporulation quand *yheI/yheH* sont surexprimés dans une souche de *B. subtilis* délétée de *kinB*.

Deux objections peuvent être formulées concernant cette étude: (i) L'absence d'un contrôle  $\Delta kinA$  qui validerait l'hypothèse avancée d'une inhibition de la sporulation par interaction directe entre KinA et le transporteur. (ii) Un choix peu adapté des fragments de YheI et YheH utilisés comme appâts dans la technique de double hybride ou pour leur surexpression chez *Bacillus*. Aucune considération n'a été faite concernant l'expression d'une protéine membranaire en tant que protéine « soluble » pour l'étude de double hybride, ni sur la probable instabilité de fragments de YheH comprenant le domaine transmembranaire plus une moitié du domaine nucléotidique, ou le domaine nucléotidique plus une moitié du domaine transmembranaire (la surexpression effective des protéines n'a pas été vérifiée dans cette étude). Néanmoins, les résultats du double hybride semblent assez robustes, car un tiers des proies obtenues avec KinA comme appât correspondraient à des fragments de YheH.

De façon intéressante, le fragment de YheH le plus court qui donne un signal positif dans l'étude de double hybride comprend 30 acides aminés, dont le motif B de Walker. Une étude moléculaire et structurale sur Spo0F, le substrat de KinA dans la cascade de phosphorylation (cf. fig. 14), a révélé que le résidu aspartate qui est phosphorylé par KinA se trouve à la fin d'un brin  $\beta$  hydrophobe (LVLLD, Tzeng *et al.* 1997), ce qui correspond à la même structure secondaire adoptée par le motif B de Walker dans les domaines nucléotidiques cristallisés (séquence de YheH correspondante : ILILD, cf. fig. 16B). Une idée séduisante émanant de ces observations est la possible phosphorylation par KinA de l'aspartate du motif B de Walker dans le domaine nucléotidique de YheH.

**Figure 41. Schéma récapitulatif des processus physiologiques de *Bacillus subtilis* faisant intervenir Yhel/YheH, complété à partir de la figure 17. (1) Hutter *et al.* 2004b; Lin *et al.* 2005; Freiberg *et al.* 2006; Urban *et al.* 2007; (2) Eymann *et al.* 2002; (3) Wiegert *et al.* 2001; (4) Uicker *et al.* 2006; (5) Eichenberger *et al.* 2004; (6) Fukushima *et al.* 2006; (7) Ochi *et al.* 1983; (8) Ochi *et al.* 1982; (9) Rhaese *et al.* 1975; (10) Cao *et al.* 2002a; (11) Nanamiya *et al.* 2008. Voir le texte pour la description des différentes études.**



Finalement, un lien peut être établi entre les données d'induction de *yhel/yheH* par les antibiotiques et l'observation faite par Fukushima *et al.* (2006) que la surexpression de *yhel/yheH* inhibe l'entrée en sporulation. Une étude de 1983 montre notamment que certains antibiotiques ont des effets inhibiteurs sur la sporulation à des concentrations où la croissance est à peine affectée (cf. fig. 41 ; Ochi *et al.* 1983). Ces résultats sembleraient indiquer que certaines caractéristiques de l'appareil traductionnel (des ribosomes) seraient indispensables à la sporulation, mais pas à la croissance (Ochi 2007). Les antibiotiques capables d'inhiber la sporulation à des concentrations subinhibitrices sont majoritairement des inhibiteurs de la synthèse protéique, comme le chloramphénicol, l'érythromycine, l'acide fusidique, le thiostrepton ou la spectinomycine (Ochi *et al.* 1983), qui sont tous capables d'induire l'expression de *yhel/yheH* (cf. tableau 11). D'autres antibiotiques qui n'affecteraient pas spécifiquement la sporulation (aucun effet n'est observable sauf à des concentrations où ils inhibent significativement la croissance) comme la puromycine, la rifampicine ou la streptomycine, ne semblent pas non plus capables d'induire l'expression du transporteur (cf. tableau 11). A l'issue de ces observations, on peut imaginer que l'inhibition de la sporulation observée en présence de certains antibiotiques résulterait de la surexpression du transporteur Yhel/YheH induite par ces composés.

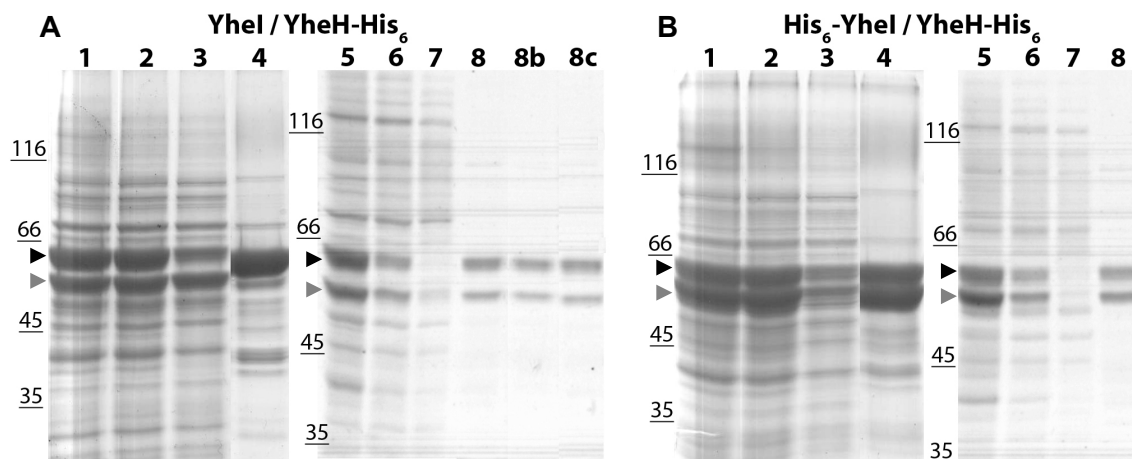
## PURIFICATION DE L'HÉTÉRODIMÈRE YheI/YheH

Après l'étude de YheI/YheH dans un environnement membranaire et cellulaire, la purification du transporteur a été abordée dans le but de mener une étude biochimique et structurale de l'hétérodimère. En partant des fractions membranaires préparées à partir d'*E. coli* BL21(DE3) surexprimant YheI et YheH-His<sub>6</sub> (cf. fig. 33A, piste 4), le transporteur a été purifié par chromatographie d'affinité sur résine de Ni<sup>2+</sup>-agarose après solubilisation des membranes par du détergent à une concentration de 1% (w/v). Il s'est avéré très rapidement que, le transporteur n'étant étiqueté que sur une sous-unité (YheH), la sous-unité non étiquetée (YheI) est retenue sur la résine avec une efficacité moindre (cf. fig. 42A, pistes 3 et 7) et est éluée avec un rendement plus faible que YheH (cf. fig. 42A, pistes 4 et 8). L'écart observé à partir de la stœchiométrie attendue 1 :1 est plus prononcé quand la fos-choline 12 est utilisée comme détergent, mais également visible en présence de n-dodécyl-β-maltopyranoside (DDM). Cela indique que le détergent est vraisemblablement capable de déstabiliser l'association entre YheI et YheH, la fos-choline 12 étant plus drastique que le DDM.

Pour atténuer cette déstabilisation, une solution envisageable serait une diminution de la concentration de détergent. Des études portant sur le réticulum sarcoplasmique (SR) montrent qu'un ratio DDM:protéine de 10 (w/w) (comme celui utilisé dans cette étude) est largement en excès, un ratio 5-fois plus faible aboutissant presque à la solubilisation totale de ces membranes (Le Maire *et al.* 2007). Ces observations faites sur le SR pourraient être transposables aux membranes d'*E. coli*, dans la mesure où le ratio lipide:protéine des membranes du SR (0.5 w/w ; Le Maire *et al.* 2007) n'est pas très éloigné de celui estimé pour *E. coli* (~0.4 w/w, indépendamment de la surexpression protéique ; Weiner *et al.* 1984). Étant donné le rendement plutôt faible de solubilisation de YheI/YheH obtenu en DDM (cf. fig. 42 piste 6 ou fig. 43), nous avons choisi de n'en diminuer la concentration qu'après solubilisation des membranes et avant de réaliser la chromatographie d'affinité. Les purifications d'autres transporteurs ABC dimériques suggèrent notamment que la dissociation induite par la forte concentration de détergent utilisée lors de la solubilisation est réversible : un dimère de BmrA est détecté en solution à 0.05% DDM (Ravaud *et al.* 2006), et les transporteurs MsbA et Sav1866 cristallisent sous forme dimérique (Dawson *et al.* 2006; Ward *et al.* 2007). Cependant, après dilution de la fraction membranaire solubilisée au 1/2e et au 1/4e, la protéine éluée présente toujours la même disproportion des deux sous-unités (cf. fig. 42, pistes 8b et 8c).

Puisque diminuer encore plus la concentration en détergent pourrait entraîner l'agrégation de la protéine et/ou la co-purification de contaminants, nous avons décidé d'introduire une étiquette hexahistidine dans la deuxième sous-unité (YheI). L'introduction d'une deuxième étiquette dans le dimère permettrait d'augmenter le rendement d'hétérodimère purifié (en supposant que la dissociation de YheI et YheH par le détergent soit réversible), voire d'accroître la probabilité de garder le dimère associé grâce au double accrochage à la résine.

**Figure 42. Chromatographie d'affinité sur  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose de Yhel/YheH**, dont l'une (A) ou les deux (B) sous-unités portent une étiquette hexahistidine. Les membranes contenant Yhel/YheH (1,5) ont été solubilisées à 1-2 mg protéine/ml avec 1% (w/v) détergent (1 : fos-choline 12 ; 5 : dodécylmaltoside). Après une étape de centrifugation à 180000 xg pendant 1 heure, le surnageant (2,6) a été incubé avec la résine de  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose (3,7 : fraction non retenue). Après lavage de la résine à 0.05% DDM (w/v), la protéine a été éluée avec 250 mM imidazole et 0.05% DDM (4,8). 8b, 8c : éluutions obtenues en diluant la fraction soluble (6) jusqu'à une concentration finale de 0.5% DDM (8b) ou 0.25% DDM (8c) avant de réaliser la chromatographie. Gel à 10% (1-4) ou à 9% acrylamide (5-8) coloré au bleu de Coomassie, marqueurs de poids moléculaire indiqués en kDa. Flèche noire : YheH, flèche grise : Yhel.

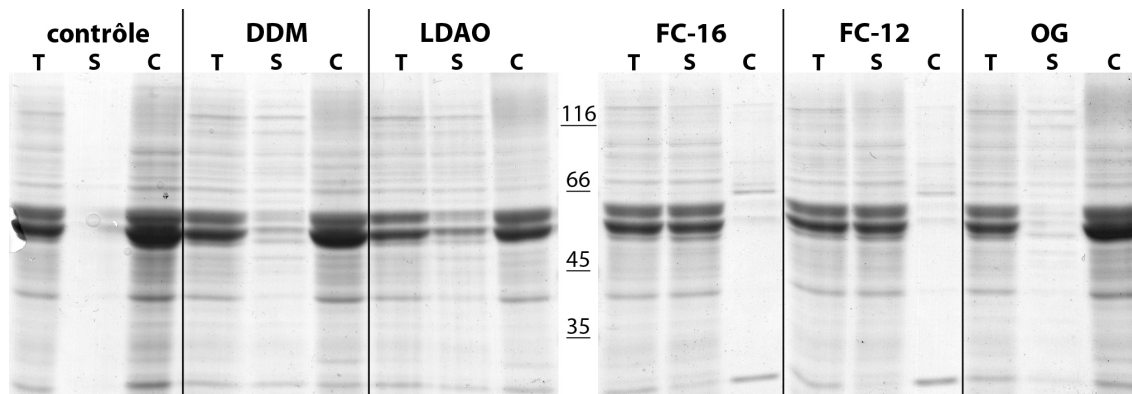


Les transporteurs ABC homodimériques recombinants tels qu'ABCG2 (McDevitt *et al.* 2006; Pozza *et al.* 2006), BmrA (Steinfels *et al.* 2004), LmrA (Margolles *et al.* 1999), Sav1866 (Dawson *et al.* 2006) ou MsbA (Doerrler *et al.* 2002; Ward *et al.* 2007) ont été purifiés sous forme active avec une étiquette dans chaque sous-unité. De même, la purification d'un hétérodimère ABCG5/ABCG8 fonctionnel a été obtenue à partir des deux sous-unités étiquetées (Wang *et al.* 2006). Dans ce travail, pour des raisons de simplicité technique et afin de conserver le couplage traductionnel, nous avons introduit la deuxième étiquette hexahistidine dans l'extrémité N-terminale de Yhel, résultant en l'hétérodimère His<sub>6</sub>-Yhel/YheH-His<sub>6</sub>. Conformément à nos attentes, l'utilisation de cette construction a permis d'augmenter sensiblement le rendement de Yhel purifié (cf. fig. 42B).

### Le choix du détergent

Afin d'optimiser la purification de l'hétérodimère His<sub>6</sub>-Yhel/YheH-His<sub>6</sub>, nous avons tout d'abord examiné la capacité de différents détergents à solubiliser le transporteur surexprimé dans les membranes d'*E. coli*. Parmi les détergents étudiés (cf. fig. 43), ceux de la série fos-choline (consistant en un groupement phosphocholine estérifié avec une chaîne alkyle) se sont avérés efficaces à quasi 100% pour solubiliser Yhel/YheH (ainsi que toutes les protéines membranaires endogènes). Ceci rejoint les conclusions d'une étude portant sur 122 protéines membranaires de levure, où la fos-choline a été le seul détergent à réussir la solubilisation de toutes les protéines étudiées (White *et al.* 2007). De même, ce détergent s'est avéré le plus efficace pour solubiliser des protéines membranaires eucaryotes exprimées dans *S. cerevisiae*, avec ~75% des 17 protéines étudiées effectivement extraites (Newstead *et al.* 2007).

**Figure 43. Solubilisation de YheI/YheH dans les membranes d'*E. coli* avec différents détergents.** Les membranes contenant His<sub>6</sub>-YheI/YheH-His<sub>6</sub> ont été incubées à 2 mg protéine/ml pendant 2 heures à 4°C en absence de détergent (contrôle) ou avec 1% (w/v) des détergents indiqués (T : fraction totale). Après centrifugation pendant 75 minutes à 160000 xg, la présence de protéine dans le surnageant (S) et dans le culot (C) a été vérifiée sur gel à 10% acrylamide coloré au bleu de Coomassie, en déposant 15 µg de protéine de la fraction totale et la quantité équivalente des fractions soluble et insoluble. Marqueurs de poids moléculaire en kDa. DDM : dodécylmaltoside, LDAO : lauryldiméthylamineoxide, FC-16 : fos-choline 16 ; FC-12 : fos-choline 12 ; OG : octylglucoside.



Parmi les autres détergents zwitterioniques testés, le LDAO (cf. fig. 43) et le z3.12 (résultats non montrés) atteignent un niveau de solubilisation relativement bas, et le CHAPS semble solubiliser très peu efficacement YheI/YheH (résultats non montrés). Dans les détergents non-ioniques, l'octylglucoside (OG) permet à peine de solubiliser le transporteur et le DDM n'en solubilise qu'une faible partie (cf. fig. 43). L'efficacité de solubilisation du dodécylthiomaltoside semble comparable à celle du DDM, et l'hecameg (méthyl-6-O-(N-heptylcarbamoyle)- $\alpha$ -D-glucopyranoside) est inefficace (résultats non montrés).

A partir de ce criblage de détergents, les fos-cholines 12 et 16 ont été utilisées ultérieurement étant donné leur pouvoir solubilisant ainsi que, malgré leur efficacité moindre, le DDM et le LDAO. Le DDM est utilisé couramment pour la solubilisation de transporteurs ABC (et de nombreuses protéines membranaires) sous forme active (Poolman *et al.* 2005) et le LDAO a permis de cristalliser, entre autres, le transporteur de la vitamine B<sub>12</sub> BtuCD (Locher *et al.* 2002).

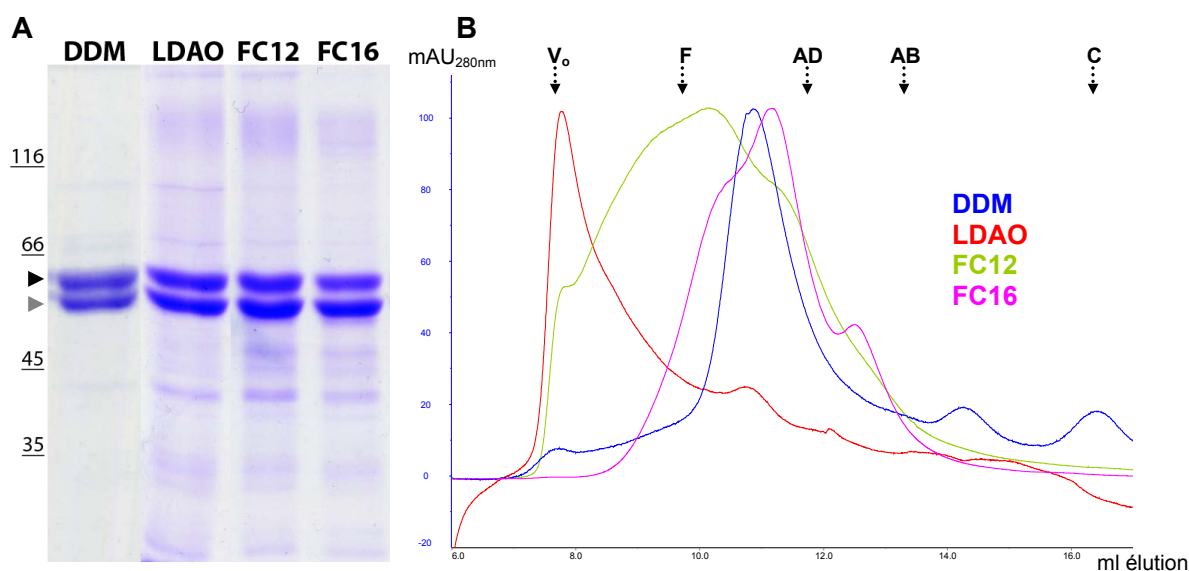
protéine purifiée en	Rendement		Activité ATPase			
	mg/l culture	% (sur mg initiaux)	en détergent			en protéo-liposomes
			DDM	LDAO	FC16	
DDM	4.6	2.1	++	+	nd	+++
LDAO	6.6	3	-	+	nd	-
FC12	55	25	-	nd	- <sup>a</sup>	-
FC16	77	35	-	nd	- <sup>a</sup>	-

**Tableau 13. Rendement obtenu pour les purifications avec différents détergents et activité ATPase mesurée pour ces différentes préparations de YheI/YheH.** Le rendement de la purification (en %) est calculé sur la quantité totale de protéines membranaires mises à solubiliser. Pour le chiffrer en mg/l de culture, un rendement de 220 mg de protéines membranaires par litre de culture a été pris en compte. L'activité ATPase a été mesurée en présence de 2 mM ATP avec le système couplé PK/LDH sauf (a), où un dosage colorimétrique du phosphate a été réalisé (cf. Matériels et Méthodes). Pour cela, les protéines ont été diluées dans 0.02-0.05% (w/v) DDM, 0.05% (w/v) LDAO ou 0.005% (w/v) FC16 pour la mesure d'activité ou, alternativement, reconstituées avec des lipides d'*E. coli* à un rapport lipide:protéine de 20 (w/w) (cf. Matériels et Méthodes). DDM : n-dodécyl- $\beta$ -D-maltopyranoside, LDAO : lauryldiméthylamineoxide, FC16 : fos-choline 16 ; FC12 : fos-choline 12. Activité mesurée (en nmol d'ATP hydrolysés par minute et mg de protéine) : (-) 0 ; (+) ~30 ; (++) ~150 ; (+++) ~800 ; (nd) non déterminée.

Des purifications de YheI/YheH ont été alors entreprises en utilisant ces quatre détergents. La quantité de protéine récupérée à partir de ces purifications est corrélée avec le taux de solubilisation, le rendement atteint avec la fos-choline 16 étant 15-fois plus élevé que celui obtenu en DDM (cf. tableau 13). De façon intéressante, la stœchiométrie YheI:YheH observée semblerait également dépendre du détergent utilisé, un léger excès de YheI apparaissant dans le cas des fos-cholines (cf. fig. 44A).

De plus, le détergent s'est avéré jouer un rôle décisif sur l'état d'agrégation et l'homogénéité des protéines purifiées. Leur analyse par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) révèle des protéines largement agrégées dans le cas des purifications en LDAO et en fos-choline 12, une protéine non agrégée mais pluridisperse dans le cas de la fos-choline 16 et une protéine plutôt monodisperse en DDM (cf. fig. 44B). Dans le cas du DDM, la protéine est éluée sous forme d'un pic majoritaire correspondant à un poids moléculaire apparent de ~220 kDa selon la calibration de la colonne. Même si l'estimation de la taille des protéines membranaires par cette technique n'est que très approximative, cette valeur de 220 kDa serait cohérente avec la masse moléculaire du transporteur (142 kDa) plus la masse d'une micelle de DDM (70 kDa, VanAken *et al.* 1986; Strop *et al.* 2005).

Nous avons ensuite étudié l'état fonctionnel de ces protéines purifiées en mesurant leur activité ATPase. Dans un premier temps, des mesures ont été effectuées en détergent, en incluant dans le tampon de mesure le même détergent que celui utilisé pour la purification. Dans ces conditions, seule la protéine purifiée en DDM montrait une activité ATPase significative (~150 nmol d'ATP hydrolysés par minute et mg de protéine; cf. tableau 13).



**Figure 44. Purification de YheI/YheH dans différents détergents.** **A** : Gel à 10% acrylamide coloré au bleu de Coomassie montrant la protéine purifiée (5 µg/puits, sauf « DDM » : 4 µg) par chromatographie d'affinité sur Ni<sup>2+</sup>-agarose, réalisée dans les détergents indiqués. Marqueurs de poids moléculaire en kDa. DDM : dodécylmaltoside, LDAO : lauryldiméthylamineoxyde, FC16 : fos-choline 16 ; FC12 : fos-choline 12. Flèche noire : YheH ; flèche grise : YheI. **B** : Chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (*GE Healthcare*) dans 0.05% (w/v) DDM (cf. Matériels et Méthodes). 500 µl contenant 0.1-1 mg de protéine purifiée dans différents détergents (cf. gel à gauche) ont été injectés et l'absorbance de l'éluât a été suivie à 280 nm (les profils d'éluat ont été normalisés). Les volumes d'éluat des protéines utilisées pour la calibration sont indiqués en haut: ferritine (F, 440 kDa), aldolase (AD, 158 kDa), albumine (AB, 37 kDa), chymotrypsinogène A (C, 25 kDa), V<sub>0</sub> : volume mort.

La question s'est posée de savoir si le détergent dans le tampon de mesure pouvait inhiber l'activité ATPase du transporteur, la protéine purifiée en DDM perdant en effet 80% de son activité quand elle est diluée dans du LDAO (cf. tableau 13). Puisque le DDM ne semble pas inhiber son activité, YheI/YheH purifié dans les autres détergents a été dilué dans du DDM avant de mesurer l'activité ATPase, mais cela n'a pas non plus permis de détecter une activité ATPase pour les protéines purifiées en LDAO ou fos-choline.

Ce résultat n'est pas surprenant pour les protéines en LDAO ou fos-choline 12, étant donné leur état d'agrégation révélé par la chromatographie d'exclusion de taille (cf. fig. 44B). Il était toutefois inattendu pour la protéine purifiée en fos-choline 16, qui ne semble pas agrégée, d'autant que le transporteur ABCG2 purifié en ce même détergent semblerait capable de fixer des drogues et d'hydrolyser, quoique faiblement, l'ATP (McDevitt *et al.* 2006). Le transporteur BtuCD, qui comme YheI/YheH est presque inactif en fos-choline 12, serait 20-30 % plus actif en LDAO qu'en DDM (Borths *et al.* 2005), le LDAO ayant permis d'ailleurs sa cristallisation (Locher *et al.* 2002). En revanche, le transporteur MsbA de *Pseudomonas aeruginosa* montre la même tendance que YheI/YheH : quand purifié en DDM, son activité ATPase est 9-fois plus élevée qu'après purification en LDAO (Ghanei *et al.* 2007).

Afin d'exclure une interférence dans les mesures d'activité ATPase et/ou l'inhibition du transporteur par le détergent, des reconstitutions en protéoliposomes ont été entreprises. Pour cela, les protéines ont été incubées avec des lipides d'*E. coli* solubilisés et le détergent éliminé avec des BioBeads, selon le protocole mis au point par le groupe de J. L. Rigaud et utilisé pour le transporteur BmrA (Steinfels *et al.* 2004). La capacité des BioBeads à adsorber le DDM et le LDAO est bien documentée (Rigaud *et al.* 1998; Chami *et al.* 2001) et a été également vérifiée pour les fos-cholines (D. Lévy, résultats non publiés). Les mesures d'activité ATPase des protéines reconstituées (cf. tableau 13) confirment les résultats obtenus en détergent : seul YheI/YheH purifié en DDM est actif. Aussi notre choix s'est porté sur le DDM pour la purification du transporteur YheI/YheH.

### *Activité, homogénéité et stabilité de YheI/YheH purifié*

En plus du détergent, le temps d'induction de la culture bactérienne pour produire YheI/YheH s'est avéré également avoir un impact important sur l'issue de la purification. L'induction étant réalisée initialement pendant 12 heures, la réduction de cette étape à 6 heures a eu plusieurs conséquences avantageuses :

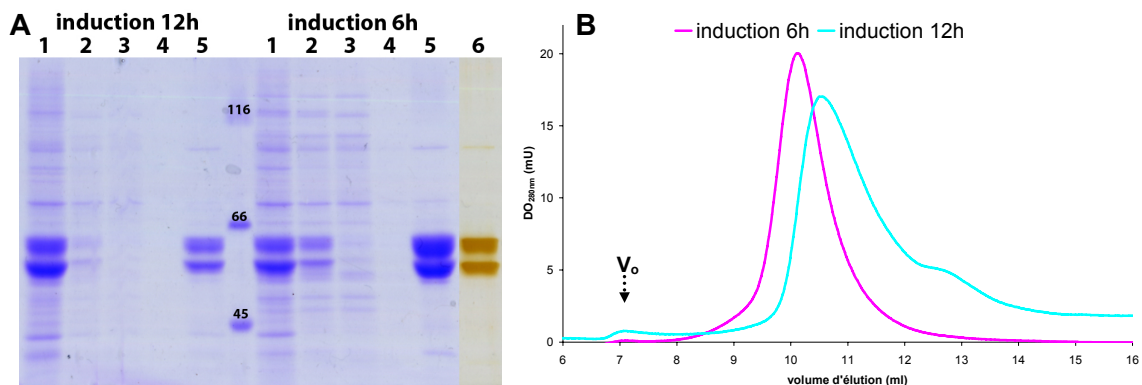
1. Malgré une quantité de YheI/YheH légèrement plus faible dans la membrane, le rendement obtenu à la fin de la purification est ~5-fois plus élevé (atteignant ~10% des protéines membranaires mises à solubiliser), la solubilisation des membranes par le DDM étant notamment plus efficace à l'issue d'une induction de 6 heures (cf. fig. 45A). La concentration de la protéine obtenue est également plus élevée (2 à 3-fois ; la fraction d'élution de  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose la plus concentrée est à ~2 mg protéine/ml).



- La protéine ainsi purifiée possède une activité ATPase 50-70% plus élevée ( $\sim 260$  nmol d'ATP hydrolysés/min/mg,  $k_{cat}$   $0.6 \text{ s}^{-1}$  ; en présence de 0.05% DDM et 4 mM ATP)
- L'analyse de la protéine purifiée par chromatographie d'exclusion de taille révèle un pic d'élution plus étroit, indiquant un degré plus important de monodispersité. Le volume d'élution, légèrement plus petit, correspond à une taille estimée de  $\sim 310$  kDa et pourrait signaler la présence d'une quantité plus grande de lipide associé (cf. fig. 45B). La taille apparente de Yhel/YheH rejoint l'estimation réalisée pour le transporteur BmrA purifié en DDM ( $300 \pm 30$  kDa, Ravaud *et al.* 2006).

### Analyse par chromatographie d'exclusion de taille

L'analyse par SDS-PAGE des fractions de la chromatographie d'exclusion de taille révèle que sous le pic du profil sont présentes les deux sous-unités, Yhel et YheH (cf. fig. 45 piste 6). Etant donnée la dissociation partielle de l'hétérodimère qui semble se produire lors de la purification, il se pourrait néanmoins que les protéines Yhel et YheH présentes sous ce pic soient organisées en homodimères et non pas sous forme hétérodimérique. La différence de taille entre un homodimère (Yhel)<sub>2</sub> et un homodimère (YheH)<sub>2</sub> serait de  $\sim 24$  kDa, de telle sorte que ces formes ne pourraient pas être résolues par cette technique, étant donnée la contribution du détergent. Cependant, une preuve indirecte de l'existence dans cette fraction (ainsi que dans la protéine éluée de la résine  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose) au moins d'une partie de protéine sous forme hétérodimérique vient de l'étude fonctionnelle : les protéines en sortie de la résine  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose et de la colonne d'exclusion de taille présentent une activité ATPase significative. Des homodimères (Yhel)<sub>2</sub> et (YheH)<sub>2</sub>, s'ils existent, ne seraient pas hydrolytiques, d'après les mesures réalisées sur les membranes (cf. fig. 33B). Ceci a été également vérifié au niveau des protéines Yhel et YheH purifiées séparément (résultats présentés ultérieurement).



**Figure 45. Effet de la durée d'induction sur la purification de Yhel/YheH.** **A** : Les membranes contenant Yhel/YheH (1) suite à une induction de 12 ou 6 heures ont été solubilisées à 1 mg protéine/ml avec 1% (w/v) DDM. Après une étape de centrifugation à  $180000 \times g$  pendant 1 heure, le surnageant (2) a été incubé avec la résine de  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose (3 : fraction non retenue). Après lavage de la résine à 0.05% (w/v) DDM (4), la protéine a été éluée avec 250 mM imidazole et 0.05% DDM (5). Gel à 9% acrylamide coloré au bleu de Coomassie, marqueurs de poids moléculaire en kDa. **B** : Chromatographie d'exclusion de taille sur une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) dans 0.05% (w/v) DDM (cf. Matériels et Méthodes).  $\sim 100$   $\mu\text{g}$  (« 12h ») ou  $\sim 300$   $\mu\text{g}$  (« 6h ») de protéine purifiée ont été injectés et l'absorbance de l'éluât a été suivie à 280 nm (les profils d'élution ont été mis à l'échelle).  $V_0$  : volume mort. La fraction de la protéine « 6h » éluée à 10 ml a été analysée sur SDS-PAGE suivi de coloration à l'argent (A, piste 6).

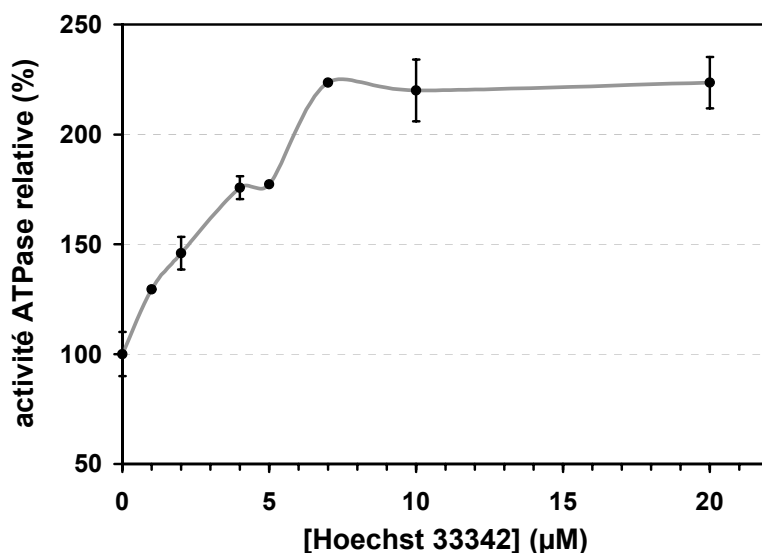
**Tableau 14. Activité ATPase en détergent d'exportateurs ABC purifiés**, et comparaison avec l'activité mesurée dans ce travail pour le transporteur YheI/YheH. P-gp : glycoprotéine-P ; FC14 : fos-choline 14 ; OG : octylglucoside. UDM : undécylmaltoside. CHAPS : 3-[(3-CHolamidopropyl)diméthylAmmonio]-1-PropaneSulfonate

Protéine	Organisme	Activité ATPase ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ )	Conditions		Référence
			ATP (mM)	détergent	
YheI/YheH	<i>B. subtilis</i>	0.26	4	0.05% DDM	ce travail
LmrC/LmrD	<i>L. lactis</i>	0.65	2.5	0.05% DDM	Lubelski <i>et al.</i> 2004
ABCG5/G8	<i>Homo sapiens</i>	0.015	10	FC14 (+ lipides)	Wang <i>et al.</i> 2006
BmrA	<i>B. subtilis</i>	1.2	10	0.05% DDM	Ravaud <i>et al.</i> 2006
MsbA	<i>E. coli</i>	0.004	2	0.1% DDM	Doerrler <i>et al.</i> 2002
	<i>E. coli</i>	1.7	saturantes	0.03% UDM	Ward <i>et al.</i> 2007
	<i>E. coli</i>	1	5	0.1% DDM	Eckford <i>et al.</i> 2008
	<i>P. aeruginosa</i>	0.06	5	0.05% DDM	Ghanei <i>et al.</i> 2007
	<i>S. thyphimurium</i>	2	saturantes	0.03% UDM	Ward <i>et al.</i> 2007
	<i>V. cholerae</i>	5.3	saturantes	0.03% UDM	Ward <i>et al.</i> 2007
P-gp	<i>Cricetulus griseus</i>	0.17	saturantes	8 mM CHAPS	Romsicki <i>et al.</i> 1998
	<i>H. sapiens</i>	1.1	0.6	1% OG	Ambudkar <i>et al.</i> 1992
	<i>H. sapiens</i>	0.74	saturantes	0.1% DDM	Al-Shawi <i>et al.</i> 2003
(MDR3)	<i>Mus musculus</i>	0.17	10	<0.01% DDM	Lerner-M. <i>et al.</i> 1999

## Etude de l'activité ATPase

L'activité ATPase mesurée pour la protéine YheI/YheH est du même ordre que celles publiées précédemment pour des exportateurs ABC purifiés (cf. tableau 14). La variabilité des données publiées (allant de 0.004 jusqu'à 5.3  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ), voire pour une même protéine (cf. MsbA d'*E. coli*, tableau 14), révèle que non seulement les propriétés intrinsèques du transporteur influencent l'activité observée, mais également la procédure de purification et/ou de mesure. L'activité de YheI/YheH est 4-20 fois plus faible que l'activité maximale publiée pour les homodimères BmrA ou MsbA, cette différence pouvant relever des propriétés des sites nucléotidiques qui seront discutées plus loin. Parmi les hétérodimères, la protéine LmrC/LmrD a été purifiée avec une activité 3-fois plus élevée que YheI/YheH, ce qui contraste avec la qualité de purification atteinte et la stœchiométrie apparente entre les deux sous-unités, telles que présentées dans Lubelski *et al.* (2004 ; 2006b). Cette activité relativement importante enregistrée pour LmrC/LmrD pourrait s'expliquer par le fait que ce transporteur a été surexprimé de façon homologue chez *L. lactis*. Finalement, l'hétérodimère ABCG5/G8 a été purifié à partir de cellules de *Pichia pastoris* avec une activité ATPase 15-fois plus faible que celle de YheI/YheH, malgré son « activation » préalable avec des lipides (Wang *et al.* 2006). D'après nos résultats, cette faible activité pourrait éventuellement être liée à l'utilisation de la fos-choline 14 comme détergent durant la purification.

Confirmant les résultats obtenus sur les membranes (cf. fig. 33B), l'activité ATPase de YheI/YheH purifié est inhibée par l'ortho-vanadate, avec moins de 20% de son activité conservée en présence de 0.5 mM vanadate. De façon intéressante, l'activité ATPase de YheI/YheH en détergent est stimulée plus de 2-fois par l'ajout du Hoechst 33342 (cf. fig. 46), avec une stimulation maximale atteinte à une concentration de drogue de  $\sim 10 \mu\text{M}$  (rapport molaire drogue:protéine de  $\sim 70$ ).



**Figure 46. Stimulation de l'activité ATPase de Yhel/YheH par le substrat Hoechst 33342.** L'activité ATPase de Yhel/YheH (à une concentration de  $\sim 0.14 \mu\text{M}$ ) a été mesurée à  $37^\circ\text{C}$  en présence de 4 mM ATP et 0.05% (w/v) DDM avec le système couplé PK/LDH. La valeur 100% correspond à  $160 \pm 16 \text{ nmol/min/mg}$ . Sont montrées les valeurs moyennes  $\pm$  écart type de trois expériences, sauf les points où aucune barre d'erreur n'est montrée, qui correspondent à une seule mesure.

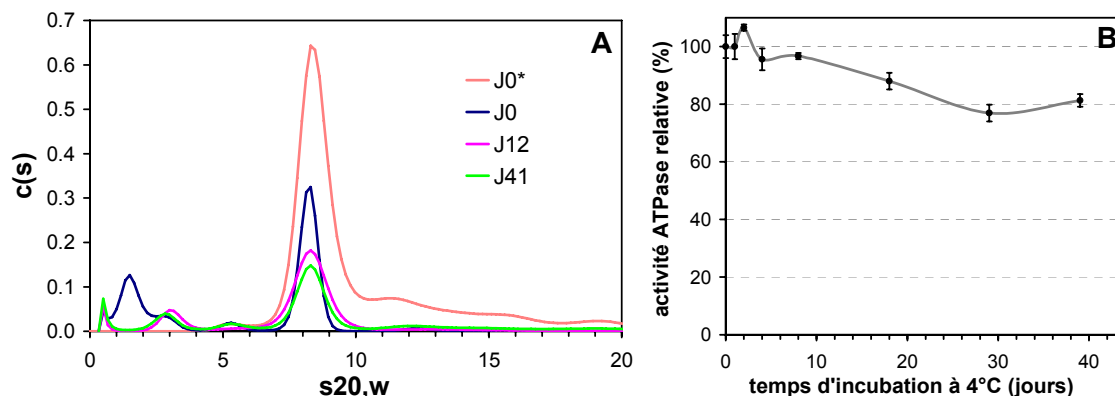
Cette stimulation signale que Yhel/YheH purifié conserve non seulement une activité ATPase, mais il lie également du substrat et maintient un couplage entre les sites de fixation de drogue et d'hydrolyse, rendant compte de la stimulation observée. Contrairement à ces résultats, aucun effet du Hoechst 33342 ni de l'éthidium n'a été détecté sur l'activité ATPase du transporteur LmrC/LmrD purifié (Lubelski *et al.* 2004), alors que ces drogues sont transportées par LmrC/LmrD. De la même manière, la vinblastine, un substrat de la glycoprotéine-P, ne stimule pas son activité ATPase en détergent (Ambudkar *et al.* 1992). Ces différences dans la modulation de l'activité ATPase par le substrat observées entre Yhel/YheH, LmrC/LmrD et la glycoprotéine-P pourraient s'expliquer par leur niveau d'activité ATPase basale (en absence de substrat). L'activité basale plus forte mesurée pour le transporteur LmrC/LmrD et la glycoprotéine-P purifiés pourrait traduire un état activé que le substrat ne serait pas en mesure de stimuler davantage.

Contrairement aux résultats obtenus avec le Hoechst 33342, aucune stimulation de l'activité de Yhel/YheH n'a été enregistrée en présence de la doxorubicine. Cette observation rejoint celles faites à propos de Cdr1p : alors que la liaison de tous les substrats testés au transporteur a été mise en évidence, seulement deux parmi eux sont capables de stimuler son activité ATPase (Shukla *et al.* 2006). Dans ce sens, il a été montré que l'interaction de diverses drogues avec l'état de transition de la glycoprotéine-P n'est pas unique, ce qui résulte en une stimulation différentielle de son activité ATPase (Al-Shawi *et al.* 2003).

### Analyse par ultracentrifugation analytique

La protéine Yhel/YheH a été également étudiée par des expériences de vitesse de sédimentation en ultracentrifugation analytique (AUC) (réalisées par F. Manon et C. Ebel, Institut de Biologie Structurale, Grenoble). Cette étude révèle aussi bien dans l'élution de la résine  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose que sous le pic de la chromatographie d'exclusion de taille, la présence d'une espèce majoritaire avec un coefficient de sédimentation  $s_{20,w}$  de  $\sim 8 \text{ S}$  (cf. fig. 47A).

**Figure 47. Analyse de l'état d'oligomérisation (A) et de l'activité ATPase (B) de Yhel/YheH purifié : étude de sa stabilité à 4°C.** A : La distribution du coefficient de sédimentation  $c(s)$  a été déterminée suite à des expériences de vitesse de sédimentation en AUC réalisées avec Yhel/YheH purifié par chromatographie d'affinité sur  $Ni^{2+}$ -agarose (J0\*) et après une étape additionnelle de chromatographie d'exclusion de taille (J0). L'échantillon en sortie de la colonne d'exclusion de taille a été analysé à nouveau par ultracentrifugation analytique après 12 (J12) et 41 (J41) jours d'incubation à 4°C. Expériences et analyses réalisées par F. Manon et C. Ebel (IBS). B : La protéine Yhel/YheH purifiée par chromatographie d'affinité sur  $Ni^{2+}$ -agarose a été incubée à 4°C pendant différents temps avant de mesurer son activité ATPase (à 30°C, en présence de 4 mM ATP et 0.05% (w/v) DDM, avec le système couplé PK/LDH). La valeur 100% correspond à  $244 \pm 10$  nmol/min/mg. Sont montrées les valeurs moyennes  $\pm$  écart type de trois mesures.



Cette espèce « 8 S » est interprétée comme un hétérodimère Yhel/YheH contenant 1.1-1.4 g de DDM et 0.07 g de lipides liés par g de protéine. Cette estimation a été inspirée du travail réalisé par Ravaud *et al.* (2006) sur BmrA, où les quantités de DDM et lipides liés ont été déterminées expérimentalement, obtenant  $1.5 \pm 0.6$  g/g et 0.07 g/g, respectivement. Le coefficient de sédimentation  $s_{20,w}$  obtenu dans cette étude pour l'homodimère BmrA était  $8.9 \pm 0.3$  S, comparable à celui observé ici pour Yhel/YheH.

Par ailleurs, les profils de sédimentation obtenus sont similaires pour la protéine éluée de la résine  $Ni^{2+}$ -agarose et celle présente sous le pic de la chromatographie d'exclusion de taille (cf. fig. 47A, J0\* vs. J0). Seule une proportion faible d'agrégats est visible en sortie de la résine  $Ni^{2+}$ -agarose qui seraient éliminés lors de la deuxième étape de chromatographie. Aucune espèce compatible avec un monomère Yhel ou YheH n'est observée (dont le coefficient de sédimentation est notamment estimé à  $\sim 6$  S).

L'analyse par AUC réalisée après incubation de Yhel/YheH avec des concentrations croissantes de DDM indique que l'hétérodimère commence à être déstabilisé à 0.8% (w/v) DDM (résultats non montrés). Ce résultat serait cohérent avec les observations faites lors de la purification de Yhel/YheH-His<sub>6</sub>, où une concentration de 1% (w/v) DDM déstabilise partiellement l'hétérodimère.  $\sim 50\%$  de formes monomériques (avec un coefficient de sédimentation de  $\sim 6$  S) sont détectées quand la protéine est équilibrée dans 2% (w/v) DDM (résultats non montrés).

Enfin, la stabilité de la préparation de Yhel/YheH a été étudiée après incubation prolongée à 4°C (jusqu'à 41 jours). Les profils de sédimentation obtenus par AUC montrent que la protéine se conserve à 4°C sans agréger (cf. fig. 47A). Cette absence d'agrégation est corrélée avec le maintien d'une conformation native, comme en témoigne l'activité ATPase mesurée: la protéine conserve  $\sim 80\%$  d'activité ATPase après 40 jours à 4°C (cf. fig. 47B).

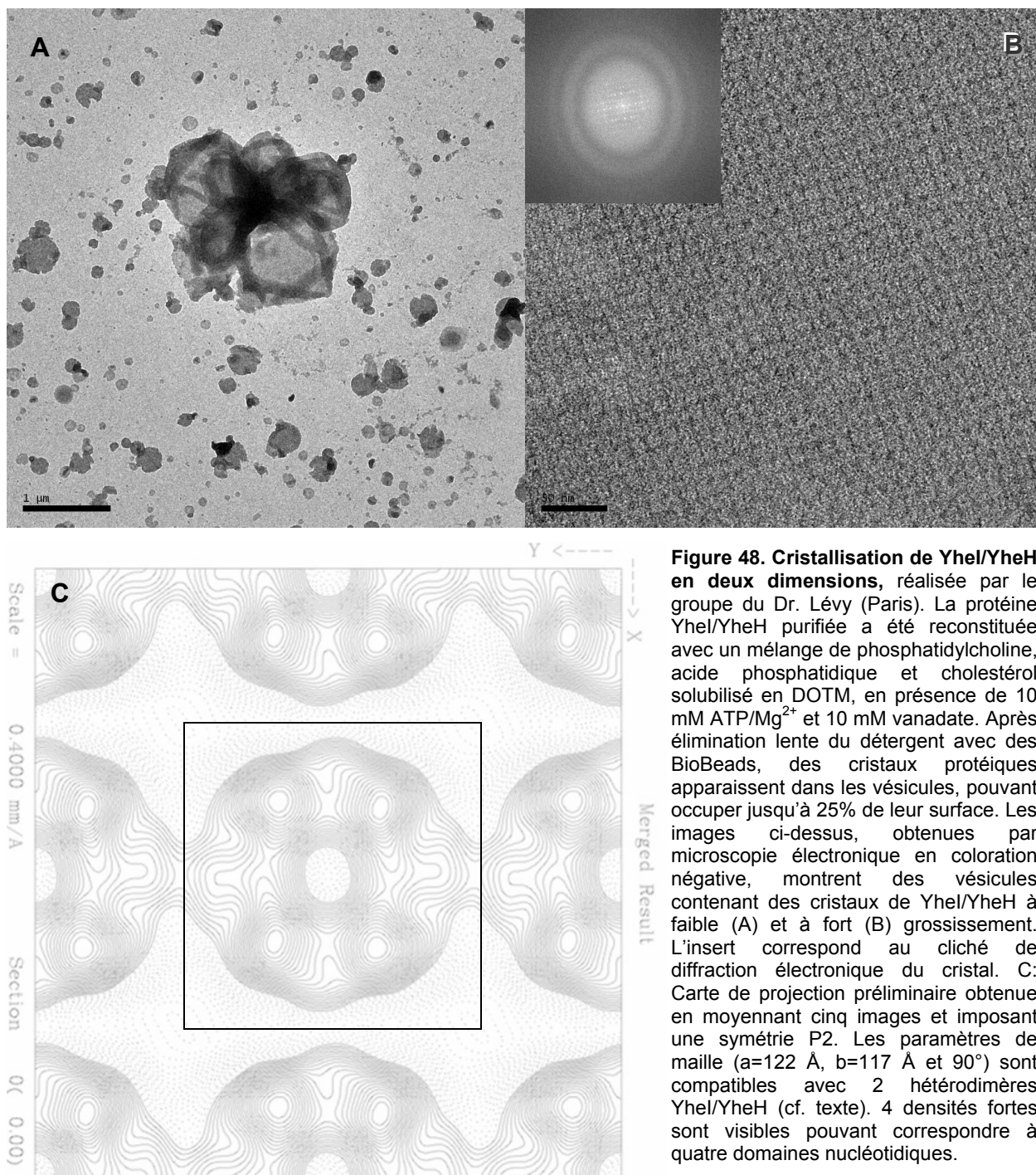
### Cristallisation de YheI/YheH

La stabilité et l'homogénéité de la protéine YheI/YheH purifiée se reflètent dans la capacité de cette protéine à cristalliser en deux dimensions après reconstitution à un rapport faible lipide:protéine. Le groupe du Dr. D. Lévy (Institut Curie, Paris) a optimisé les conditions de reconstitution et réussi à obtenir des cristaux bidimensionnels qui diffractent à  $\sim 20$  Å en coloration négative (cf. fig. 48B). Pour cela, la protéine a été reconstituée dans un mélange lipidique contenant phosphatidylcholine, acide phosphatidique (tous les deux extraits d'œuf) et cholestérol, solubilisés en n-dodécyl- $\beta$ -D-thiomaltopyranoside (DOTM). Le détergent est soumis à une élimination lente par des BioBeads, aboutissant à la formation de cristaux qui peuvent occuper jusqu'à 25% de la surface des vésicules.

Confirmant les observations faites en AUC, l'association entre les deux sous-unités YheI et YheH après purification serait suffisamment stable de façon à permettre la cristallisation du transporteur. Il est à noter que la formation de cristaux nécessite l'incubation de la protéine avec l'ATP/Mg<sup>2+</sup> et le vanadate, alors que les reconstitutions en absence de nucléotide sont très similaires. Ceci indique un changement de conformation du transporteur et témoigne de la stabilité de la conformation avec ADP/vanadate liés.

Les cristaux obtenus, reproduits au moins trois fois, révèlent la présence de YheI/YheH dans la membrane sous forme oligomérique (YheI/YheH)<sub>2</sub>. Une carte préliminaire de projection a été établie en moyennant 5 images, dont les dimensions de maille (122 Å x 117 Å, 90°) sont compatibles avec 2 transporteurs YheI/YheH (cf. fig. 48C). La taille de la projection 2D de la glycoprotéine-P a été notamment déterminée à 68 Å x 45 Å (Lee *et al.* 2002), ce qui est en accord avec les dimensions correspondantes de la structure 3D du transporteur Sav1866 (65 Å x 55 Å; Dawson *et al.* 2006).

Dans cette projection, quatre densités sont clairement visibles qui pourraient correspondre à quatre domaines nucléotidiques (cf. fig. 48C). Cependant, cette attribution n'est pas sans ambiguïté, puisque les distances entre les sommets (40 Å et 50 Å selon les deux axes) sont plus grandes que ce qui est attendu pour un transporteur en complexe avec l'ADP/vanadate. Dans cette conformation, les NBDs sont censés former un dimère fermé, une distance de  $\sim 28$  Å étant attendue si YheI/YheH adopte une conformation comparable avec celle du transporteur Sav1866 cristallisé avec du nucléotide lié. Alternativement, les densités observées pourraient correspondre à la partie extracellulaire du transporteur. Cependant, des cartes de projection obtenues pour des cristaux 2D de BmrA montrent également des distances moins importantes entre les densités correspondant aux parties extracellulaires (D. Lévy, résultats non publiés). Dans ces cristaux l'attribution des densités aux domaines extracellulaires est sans ambiguïté du fait que la topologie du transporteur BmrA est définie, la reconstitution étant réalisée de façon orientée sur une monocouche lipidique fonctionnalisée (Levy *et al.* 2001).



**Figure 48. Crystallisation de Yhel/YheH en deux dimensions**, réalisée par le groupe du Dr. Lévy (Paris). La protéine Yhel/YheH purifiée a été reconstituée avec un mélange de phosphatidylcholine, acide phosphatidique et cholestérol solubilisé en DOTM, en présence de 10 mM ATP/Mg<sup>2+</sup> et 10 mM vanadate. Après élimination lente du détergent avec des BioBeads, des cristaux protéiques apparaissent dans les vésicules, pouvant occuper jusqu'à 25% de leur surface. Les images ci-dessus, obtenues par microscopie électronique en coloration négative, montrent des vésicules contenant des cristaux de Yhel/YheH à faible (A) et à fort (B) grossissement. L'insert correspond au cliché de diffraction électronique du cristal. C: Carte de projection préliminaire obtenue en moyennant cinq images et imposant une symétrie P2. Les paramètres de maille ( $a=122$  Å,  $b=117$  Å et  $90^\circ$ ) sont compatibles avec 2 hétérodimères Yhel/YheH (cf. texte). 4 densités fortes sont visibles pouvant correspondre à quatre domaines nucléotidiques.

Si l'interprétation des cristaux de Yhel/YheH est encore préliminaire, il est certain que le transporteur (i) est capable d'adopter un arrangement cristallin, témoignant de la pureté et de l'homogénéité de la préparation, ainsi que d'une association stable entre les deux sous-unités, (ii) peut former des dimères (Yhel/YheH)<sub>2</sub> quand reconstitué dans une membrane. En revanche, les analyses par AUC indiquent sans ambiguïté que le transporteur est essentiellement monomérique (Yhel/YheH) en détergent (cf. fig. 47A). Des cristaux contenant Yhel/YheH sous forme monomérique ont été obtenus de façon épisodique, indiquant que cette forme est certainement adoptée par le transporteur en présence de lipides, mais les conditions de cristallisation se sont avérées difficilement reproductibles. Il est possible que les contacts

protéine-protéine plus étendus au niveau du dimère (YheI/YheH)<sub>2</sub> favorisent la cristallisation préférentielle de cette forme. De façon intéressante, le transporteur ABCC1 (qui possède les deux TMDs et les deux NBDs fusionnés dans un seul polypeptide, cf. fig. 7A pour sa topologie prédite) a aussi été cristallisé en 2D sous une forme dimérique (ABCC1)<sub>2</sub> (Rosenberg *et al.* 2001a), état d'oligomérisation qui serait également retrouvée dans la membrane des cellules (Yang *et al.* 2007). La capacité des transporteurs ABC à former des formes oligomériques a été documentée dans d'autres cas, aussi bien en détergent (e.g. ABCG2, McDevitt *et al.* 2006; Pdr5, Ferreira-Pereira *et al.* 2003) que dans la membrane cellulaire (e.g. ABCA1, Trompier *et al.* 2006 ; ABCG2, Xu *et al.* 2004).

Finalement, nous avons voulu vérifier si YheI/YheH est actif dans le mélange ternaire PC/PA/cholestérol utilisé pour la cristallisation et effectué pour cela des reconstitutions de la protéine dans ce mélange lipidique (à un rapport lipide:protéine de 40 w/w). Les protéoliposomes ainsi préparés montrent une activité ATPase élevée (~2 µmol/min/mg), qui n'est d'ailleurs pas modifiée quand la reconstitution est faite en PC/PA en absence de cholestérol (cf. fig. 50C).

### *Purification séparée des sous-unités YheI et YheH*

En parallèle à la purification de l'hétérodimère YheI/YheH, nous avons entrepris la purification des sous-unités séparées, dans le but de les caractériser indépendamment et mieux comprendre les propriétés du transporteur. Pour cela, des plasmides ont été construits permettant d'étiqueter les protéines de la même manière que dans la construction double, i.e. His<sub>6</sub>-YheI (à partir d'un plasmide pET15b) et YheH-His<sub>6</sub> (à partir d'un plasmide pET21b, cf. Matériels et Méthodes). La production des protéines et la purification ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le transporteur entier YheI/YheH.

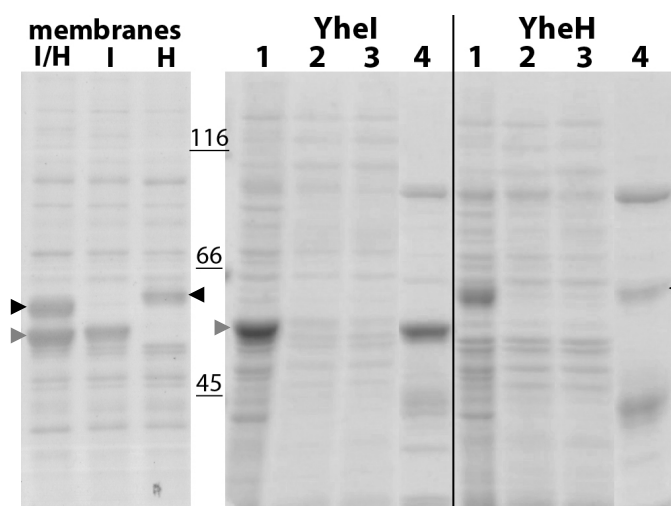
Le taux d'expression de YheI ou YheH n'est pas significativement modifié en absence de l'autre sous-unité, comme en témoigne la quantité de protéine visible dans la fraction membranaire (cf. fig. 49, ainsi que fig. 33). La même observation a été faite concernant le transporteur LmrC/LmrD (Lubelski *et al.* 2004). En revanche, dans le cas de l'hétérodimère ABCG5/G8, les niveaux d'expression dans *P. pastoris* seraient 5 à 10-fois plus importantes lors de la co-expression par rapport à l'expression séparée (Wang *et al.* 2006). Cette différence pourrait provenir du système d'expression, le contrôle post-traductionnel des protéines membranaires étant plus strict chez les eucaryotes à travers le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Si l'expression indépendante des sous-unités YheI et YheH ne semble pas affectée, la capacité du DDM à les solubiliser est drastiquement réduite par rapport au transporteur entier (cf. fig. 49 piste 2 vs. fig. 45). Ainsi, le rendement obtenu à la fin de la purification est 5-fois moins élevé que pour l'hétérodimère. Plus important, YheI et YheH purifiés séparément montrent une tendance accrue à la dégradation et un degré de pureté visiblement inférieur à

celui de l'hétérodimère (cf. fig. 49 vs. fig. 45). Ces observations traduisent vraisemblablement un mauvais repliement et/ou l'agrégation des protéines YheI et YheH quand elles sont exprimées séparément.

L'activité ATPase mesurée en détergent pour ces préparations de YheI et YheH est de  $81 \pm 7$  et  $64 \pm 2$  nmol/min/mg, respectivement (celle obtenue pour les protéines copurifiées est de  $260 \pm 3$  nmol/min/mg). L'activité mesurée pour YheI et YheH purifiés est plus importante que celle du double mutant YheI K377A/YheH K469A ( $\sim 30$  nmol/min/mg), ce qui pourrait résulter des contaminants présents dans ces préparations. En accord avec cette hypothèse, l'activité détectée pour YheI et YheH est insensible à l'inhibiteur orthovanadate.

Ces résultats confirment que la co-expression de YheI et YheH donne lieu à une entité protéique (l'hétérodimère) avec des propriétés radicalement différentes de celles observées pour les sous-unités séparées, et suggèrent fortement que la protéine purifiée après co-expression correspond essentiellement à l'hétérodimère.



**Figure 49. Purification séparée de YheI et YheH.** Le gel « membranes » montre les fractions membranaires isolées après surexpression de YheI (I), YheH (H) ou co-expression des deux (IH), 3  $\mu$ g de protéine ont été déposés par piste. Le gel à droite montre les étapes de la purification séparée de YheI et YheH : Les membranes contenant YheI ou YheH (1) ont été solubilisées à 1 mg protéine/ml avec 1% (w/v) DDM. Après une étape de centrifugation à 180000  $xg$  pendant 1 heure, le surnageant (2) a été incubé avec une résine de  $Ni^{2+}$ -agarose (3 : fraction non retenue). Après lavage, la protéine a été éluée à 250 mM imidazole et 0.05% DDM (4). Flèche noire : YheH, flèche grise : YheI. Marqueurs de poids moléculaire en kDa.



## RECONSTITUTION DU TRANSPORTEUR YheI/YheH

Pour une caractérisation approfondie du transporteur, il convient de se placer dans des conditions plus physiologiques, i.e. d'éliminer le détergent et de restituer un environnement lipidique, en reconstituant le transporteur dans des protéoliposomes. Cela est d'autant plus important que (i) plusieurs transporteurs de multiples drogues sont capables de lier des détergents en tant que substrat, ce qui peut fausser considérablement les mesures fonctionnelles (Garrigues *et al.* 2002); (ii) l'étude d'une activité de transport vectoriel nécessite la définition de deux compartiments indépendants, comme ceux séparés par la membrane des protéoliposomes (lumière et milieu extérieur).

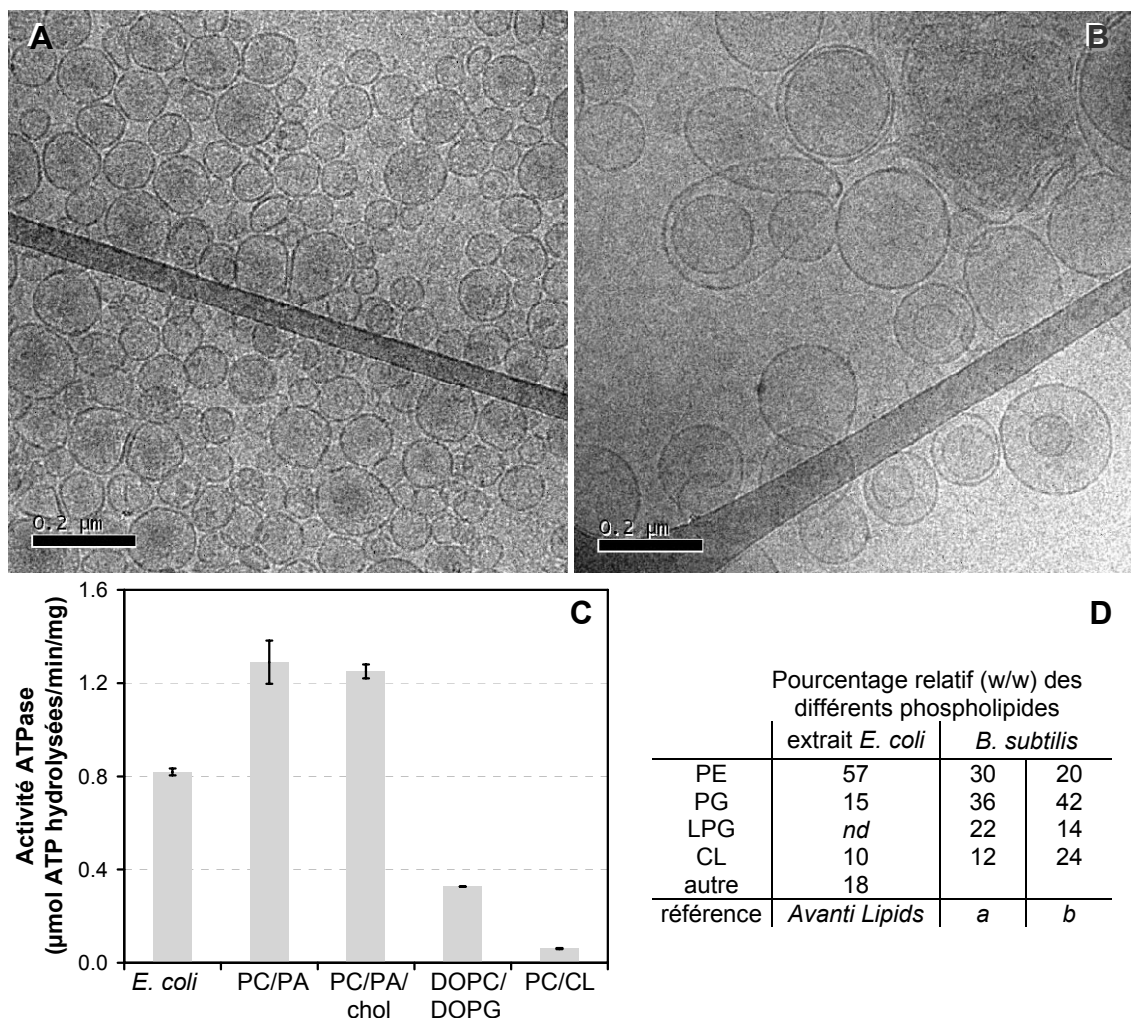
En collaboration avec le Dr. D. Lévy (Institut Curie, Paris), la reconstitution du transporteur YheI/YheH a été entreprise, à partir d'un mélange ternaire détergent/lipide/protéine et en éliminant le détergent par adsorption sur des billes hydrophobes ou BioBeads (Rigaud *et al.* 2003). Plusieurs paramètres intervenant dans ce protocole de reconstitution ont été optimisés dans ce travail :

- ∞ les lipides utilisés
- ∞ le détergent employé pour solubiliser les lipides
- ∞ le rapport lipide:protéine
- ∞ le rapport détergent:lipide

Deux critères ont été utilisés pour évaluer la qualité des préparations de protéoliposomes : (i) leur étude par cryomicroscopie électronique, permettant de visualiser la taille des protéoliposomes, leur laméarité et, le cas échéant, la présence d'agrégats ; (ii) la mesure de leur activité ATPase, comme témoin de l'état de la protéine après reconstitution, ainsi que de l'orientation d'insertion, car les protéoliposomes sont normalement imperméables à l'ATP et seuls les domaines nucléotidiques exposés vers l'extérieur contribueront au signal mesuré. Etant donné que la protéine non incorporée n'a pas été séparée des protéoliposomes, l'activité ATPase observée dépendra non seulement de l'état et de l'orientation de la protéine dans les protéoliposomes, mais également du taux d'incorporation.

### *Le choix des lipides*

5 mélanges lipidiques ont été étudiés pour la reconstitution de YheI/YheH (cf. fig. 50). L'activité ATPase plus élevée a été mesurée après reconstitution dans un mélange phosphatidylcholine/acide phosphatidique (PC/PA, 9:1 w/w). L'incorporation d'acide phosphatidique dans cette composition lipidique a comme conséquence l'attribution d'une densité de charge négative aux liposomes, diminuant leur agrégation et permettant leur conservation pendant une semaine (Lesieur *et al.* 1991).



**Figure 50. Reconstitution de Yhel/YheH avec différents lipides.** Les lipides indiqués solubilisés en décylmaltoside (détergent:lipide 3.5 mol/mol) ont été incubés avec Yhel/YheH (lipide:protéine 40 w/w) pendant 15 minutes, avant d'éliminer le détergent avec des BioBeads (cf. Matériels et Méthodes). *E. coli* : extrait total commercialisé par *Avanti* ; PC : phosphatidylcholine d'œuf ; PA : acide phosphatidique d'œuf ; chol : cholestérol ; DOPC : dioléoylphosphatidylcholine ; DOPG : dioléoylphosphatidylglycérol ; CL : cardiolipine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; (L)PG : (lyso)phosphatidylglycérol. Rapports utilisés (w/w): PC/PA 9:1 ; PC/PA/chol 7:1:2 ; DOPC/DOPG 9:1 ; PC/CL 8:2. Les protéoliposomes ont été gardés à 4°C pendant 24 heures avant de mesurer leur activité ATPase (à 37°C et en présence de 4 mM ATP), indiquée en C. Les clichés de cryomicroscopie électronique montrent des protéoliposomes issus de la reconstitution de Yhel/YheH dans des lipides d'*E. coli* (A) ou PC/PA (B) préalablement solubilisés en DDM. D: Composition relative des phospholipides de l'extrait lipidique d'*E. coli* utilisé ici (selon indications du fournisseur) et de *B. subtilis* (cultivé en milieu LB) d'après (a) Lopez *et al.* 1998 et (b) den Kamp *et al.* 1969. nd : non déterminé.

L'ajout de cholestérol au mélange PC/PA ne modifie pas l'activité de Yhel/YheH (cf. fig. 50C), suggérant que l'incorporation de la protéine dans les protéoliposomes suit le même mécanisme en absence et en présence de cholestérol et validant ainsi l'utilisation du mélange lipidique PC/PA/cholestérol pour la cristallisation du transporteur (cf. fig. 48). A la différence de Yhel/YheH, l'activité ATPase de la glycoprotéine-P est modulée par le cholestérol, et il a été proposé que ce transporteur puisse agir en tant que « flippase » de cholestérol (Garrigues *et al.* 2002). De façon inattendue, le mélange DOPC/DOPG, qui possède des propriétés similaires à celles de PC/PA, donne lieu à une activité assez faible (cf. fig. 50C). L'analyse par microscopie électronique montre que la protéine est largement agrégée après reconstitution dans ces lipides (résultats non montrés).

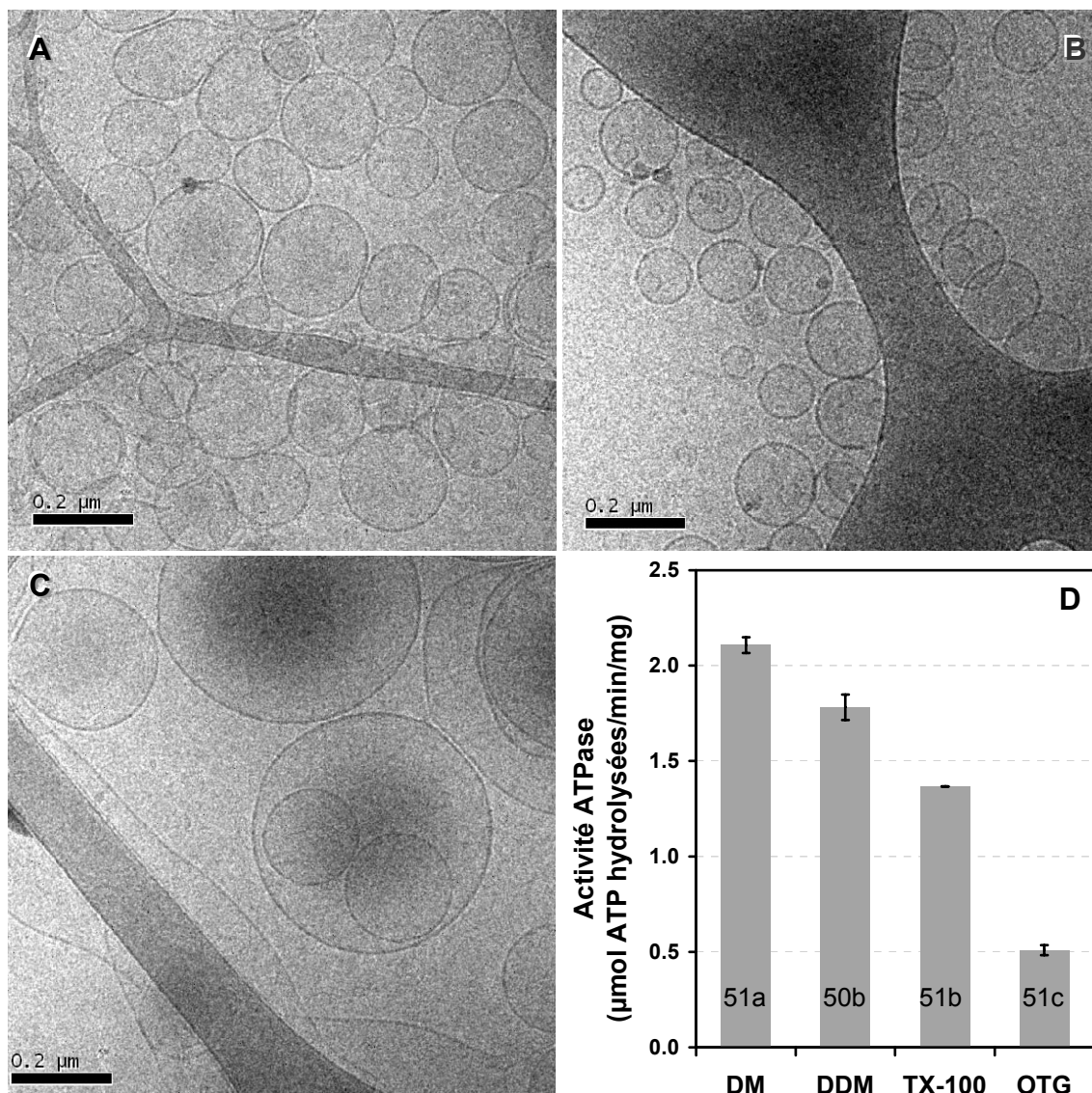
On peut souligner l'absence de corrélation entre les lipides endogènes de *B. subtilis* et ceux qui ont donné lieu à une forte activité ATPase dans nos expériences de reconstitution. Ainsi, la protéine reconstituée dans le mélange DOPC/DOPG montre une activité ATPase faible, alors que le phosphatidylglycérol serait le phospholipide majoritaire chez *B. subtilis* (cf. fig. 50D). De même, l'utilisation de la cardiolipine au lieu de l'acide phosphatidique a été néfaste à l'activité de YheI/YheH, malgré la présence importante de ce lipide dans la membrane de *B. subtilis* (cf. fig. 50C, D). S'il existe une interaction préférentielle du transporteur avec certains lipides membranaires, il est tout à fait possible que ceux-ci copurifient avec le transporteur, fait souvent observé pour les protéines membranaires (Hunte *et al.* 2008). La présence d'éventuels lipides copurifiés avec YheI/YheH mériterait d'être étudiée en complément à ce travail.

Enfin, les lipides d'*E. coli*, qui avaient donné de très bons résultats pour la reconstitution de BmrA (Steinfels *et al.* 2004), se sont avérés moins appropriés que le mélange PC/PA pour la reconstitution de YheI/YheH (cf. fig. 50C). L'étude par cryomicroscopie électronique révèle des différences importantes dans la taille des protéoliposomes obtenus dans ces deux mélanges lipidiques, avec un diamètre inférieur à 150 nm dans le cas des lipides d'*E. coli* (cf. fig. 50A) et entre 180 et 400 nm dans le cas de PC/PA (cf. fig. 50B). A l'issue de ces expériences, le mélange lipidique PC/PA a été retenu par la suite pour la reconstitution de YheI/YheH.

### *Le choix du détergent*

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de différents détergents sur le résultat de la reconstitution (détergents utilisés pour solubiliser les lipides PC/PA avant l'ajout de la protéine). Les clichés de microscopie électronique des différentes préparations obtenues révèlent que l'utilisation de différents détergents dans la reconstitution d'une même protéine, dans une même composition lipidique, peut résulter en la formation de protéoliposomes de taille et lamélarité différentes (cf. fig. 51).

L'octylthioglucooside (OTG), par exemple, conduit à la formation de protéoliposomes de grande taille (jusqu'à 700 nm de diamètre ; cf. fig. 51C). Cette même observation a été faite lors de la reconstitution d'autres protéines membranaires, ceci étant une propriété exclusive de l'OTG comparé à l'OG (Chami *et al.* 2001). Néanmoins, les protéoliposomes larges obtenues ici sont majoritairement multilamélaires (cf. fig. 51C), expliquant vraisemblablement la faible activité ATPase de cette préparation (cf. fig. 51D). Parce que la lamélarité des liposomes peut dépendre de la vitesse d'élimination du détergent (Lambert *et al.* 1998), des expériences de reconstitution ont été faites en augmentant le rapport BioBeads:détergent afin d'accélérer l'élimination de l'OTG, mais cela n'a pas conduit à l'augmentation de l'activité ATPase mesurée (résultats non montrés). D'autre part, le Triton X-100, couramment utilisé pour la reconstitution de transporteurs ABC (Geertsma *et al.* 2008), donne lieu à des protéoliposomes unilamélaires assez homogènes en taille (~100 nm de diamètre, cf. fig. 51B), qui possèdent une activité ATPase légèrement plus faible que celle obtenue avec les détergents (D)DM (cf. fig. 51D).



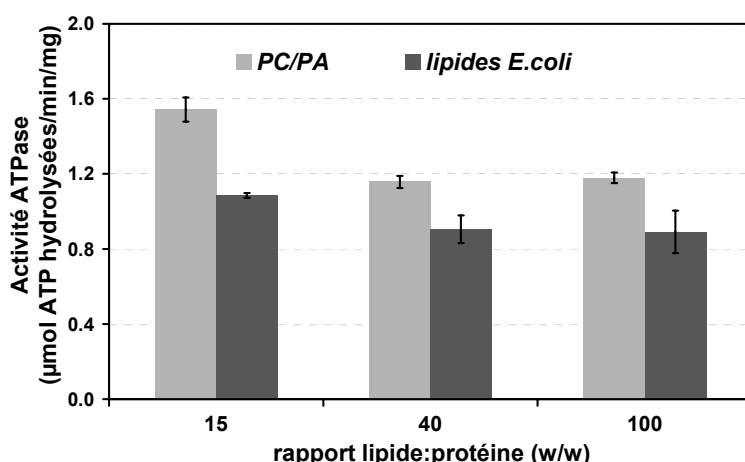
**Figure 51. Reconstitution de Yhel/YheH en PC/PA (9:1 w/w) solubilisés dans différents détergents.** Les lipides PC/PA ont été solubilisés à des rapports détergent:lipide 2-5 (mol/mol) et incubés avec Yhel/YheH (lipide:protéine 40 w/w) pendant 15 minutes, avant d'éliminer le détergent avec des BioBeads (cf. Matériels et Méthodes). DM : décylmaltoside ; DDM : dodécylmaltoside ; TX-100 : Triton X-100 ; OTG : octylthioglucoiside. Les protéoliposomes ont été gardés à 4°C pendant 24 heures avant de mesurer leur activité ATPase (à 37°C et en présence de 4 mM ATP ; résultats indiqués en D). Les clichés de cryomicroscopie électronique montrent des protéoliposomes formés après solubilisation des lipides par DM (A), TX-100 (B), OTG (C), DDM (fig. 50B).

Parmi les détergents étudiés, les dérivés maltosides conduisent à la formation de protéoliposomes avec l'activité ATPase la plus élevée (cf. fig. 51D). Leur taille ne varie pas significativement entre le dérivé décyl (DM) et dodécyl (DDM), mais plus de protéoliposomes multilamellaires sont observés quand le DDM est utilisé (cf. fig. 50B vs. 51A). Cette propriété pourrait expliquer l'activité ATPase légèrement plus élevée mesurée avec le DM (cf. fig. 51D). Ceci étant, après analyse de plusieurs expériences de reconstitution, il semble difficile d'affirmer une différence entre l'activité des reconstitutions faites en DM ( $1,9 \pm 0,4 \mu\text{mol/min/mg}$  ;  $n = 5$ ) et en DDM ( $1,7 \pm 0,6 \mu\text{mol/min/mg}$  ;  $n = 10$ ).

### Rapport lipide:protéine, détergent:lipide et orientation des protéines

Un paramètre que nous avons ensuite exploré est le rapport lipide:protéine utilisé lors de la reconstitution. Ce ratio est particulièrement pertinent pour l'étude de l'activité de transport, puisqu'il détermine la quantité de protéine présente par protéoliposome (en supposant que la taille des protéoliposomes soit constante). A un rapport lipide:protéine de 80 (w/w), considérant une distribution homogène, un protéoliposome de 200 nm de diamètre contient ~25 molécules de protéine de 100 kDa (Rigaud *et al.* 2003). L'activité spécifique par liposome sera d'autant plus élevée que le rapport lipide:protéine (LPR) est bas, mais le choix du LPR est limité par la possible agrégation de la protéine à bas LPR, ainsi que par la perte d'étanchéité des protéoliposomes.

Les expériences précédentes ayant été réalisées à un LPR de 40 (w/w), nous avons voulu vérifier l'effet des variations de ce paramètre sur l'activité ATPase de YheI/YheH. Les résultats obtenus (activité à LPR 100 = LPR 40 < LPR 15, cf. fig. 52) montrent essentiellement que (i) YheI/YheH n'agrège pas en diminuant le rapport LPR, ce qui rejoint les observations faites lors de la reconstitution à bas LPR (<1 w/w) pour cristalliser la protéine; (ii) la diminution du LPR à 15 (w/w) entraîne une légère augmentation de l'activité mesurée (20-30%), ce qui pourrait s'expliquer par une perméabilisation des protéoliposomes à ce LPR rendant accessible l'ATP aux domaines nucléotidiques des transporteurs orientés « right side out » (avec les NBDs localisés à l'intérieur des liposomes). En effet, l'orientation des transporteurs ABC reconstitués est souvent déterminée de façon approximative en traitant les protéoliposomes avec des quantités croissantes de détergent (Al-Shawi *et al.* 2003; Shukla *et al.* 2007; Eckford *et al.* 2008) ou d'autres composés avec des propriétés perméabilisantes comme l'alaméthicine (Ramachandra *et al.* 1998). Ainsi, les résultats montrés dans la figure 52 indiqueraient que ~80% des molécules de YheI/YheH incorporées dans les protéoliposomes possèdent une orientation "inside out" (avec les NBDs exposés vers l'extérieur).



**Figure 52. Reconstitution de YheI/YheH à différents rapports lipide:protéine.** Un mélange PC/PA (9:1 w/w) ou des lipides totaux d'*E. coli* ont été solubilisés avec du DDM et incubés avec YheI/YheH à différents LPR, avant d'éliminer le détergent avec des BioBeads (cf. Matériels et Méthodes). L'activité ATPase des protéoliposomes a été mesurée à 37°C et en présence de 4 mM ATP, immédiatement après reconstitution.

Une autre indication sur l'orientation des protéines reconstituées ressort de la comparaison de protéoliposomes préparés après traitement de liposomes avec des concentrations croissantes de détergent. Il a été notamment montré que la saturation de liposomes avec certains détergents (i.e. au rapport maximal détergent:lipide qui ne permet pas de solubiliser les liposomes,  $R_{sat}$ ) permet d'incorporer des protéines dans les liposomes avec une orientation unique (incorporation directe, Rigaud *et al.* 2003). Dans le cas des transporteurs ABC, il est attendu que la taille et l'hydrophilicité des domaines nucléotidiques imposent une orientation « inside out » lors d'une incorporation directe. Ce postulat est vérifié dans le cas de l'incorporation directe de la  $Ca^{2+}$ -ATPase et la  $F_0F_1$ -ATPase (Rigaud *et al.* 1995). La proportion de transporteur orientée avec les NBDs vers l'extérieur dans des préparations réalisées à différents rapports détergent:lipide peut ainsi être déduite en se rapportant à l'activité obtenue au rapport  $R_{sat}$ .

Nous avons réalisé ici des incorporations de Yhel/YheH dans des liposomes PC/PA incubés avec du DM à des rapports détergent:lipide entre 0.5 et 2.5 (mol/mol). L'activité ATPase maximale a été obtenue à un rapport de 0.6, notamment ~25% plus élevée que celle obtenue après solubilisation totale (résultats non montrés). Il a été vérifié par cryomicroscopie électronique que les liposomes sont encore fermés après incubation avec du DM au rapport détergent:lipide de 0.6, alors que des liposomes ouverts sont déjà visibles à un rapport de 0.75 (résultats non montrés).

Ces expériences révèlent que (i) le décylmaltoside permet une incorporation directe, comme cela avait été montré pour le dérivé dodécyl (Lambert *et al.* 1998); (ii) après solubilisation totale des liposomes (au rapport 2.5 mol/mol, i.e. en reconstituant la protéine à partir d'un mélange ternaire détergent/lipide/protéine), Yhel/YheH s'incorpore dans les protéoliposomes à ~80% avec une orientation « inside out » (avec les NBDs vers l'extérieur), d'après la comparaison des activités ATPases obtenues. Cette estimation est identique à celle déduite de la reconstitution de Yhel/YheH à différents rapports lipide:protéine (cf. fig. 52) et indique que l'activité ATPase de Yhel/YheH reconstitué est 25% plus élevée que celle déterminée dans ce travail (étant donné que les conditions de reconstitution utilisées impliquent habituellement la solubilisation totale des lipides).

Par conséquent, nos résultats suggèrent que l'orientation de Yhel/YheH dans les protéoliposomes formés à partir d'un mélange ternaire lipide:détergent:protéine n'est pas aléatoire, avec une préférence pour l'orientation « inside out » (NBDs vers l'extérieur). Des expériences ont été réalisées en parallèle avec BmrA qui semblent indiquer que l'incorporation de ce transporteur à partir d'un mélange ternaire détergent/lipide/protéine s'effectue de manière 100% orientée « inside out » (résultats non montrés). Une orientation préférentielle a été également observée pour d'autres protéines membranaires, qui a été expliquée par les propriétés de charge ou d'encombrement stérique de la protéine (Rigaud *et al.* 1995).

## Activité ATPase de Yhel/YheH reconstitué

### Bilan des différentes mesures

Sur l'ensemble des expériences de reconstitution réalisées dans PC/PA et à un rapport LPR de 40 (w/w), l'activité ATPase mesurée pour Yhel/YheH en protéoliposomes est de  $1,7 \pm 0,6$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  (après solubilisation totale des lipides en DDM,  $n = 10$  reconstitutions avec, au total, trois préparations différentes de protéine). Cette activité ATPase ( $\sim 4 \text{ s}^{-1}$ ) est 7-fois plus élevée de celle que nous avons déterminée pour la protéine en détergent. La reconstitution de BmrA dans des lipides d'*E. coli* accroît également son activité ATPase jusqu'à 10-fois (Steinfels *et al.* 2004). Pour la glycoprotéine-P, des augmentations de l'activité ATPase après reconstitution ont été reportées allant de 30% (Al-Shawi *et al.* 2003) jusqu'à 200% (Romsicki *et al.* 1998) ou 500% (Lerner-Marmarosh *et al.* 1999). Au contraire, la reconstitution de MsbA (Eckford *et al.* 2008) ou de l'importateur de vitamine B<sub>12</sub> BtuCD (Borths *et al.* 2005) diminuerait de 3-fois leur activité. Cette disparité dans les résultats publiés pour différents transporteurs reflète vraisemblablement une importante variabilité expérimentale et renforce l'intérêt d'optimiser l'étape de reconstitution.

La comparaison de l'activité ATPase observée pour Yhel/YheH dans les trois systèmes utilisés dans ce travail (vésicules de membrane d'*E. coli*, détergent, protéoliposomes) révèle une influence non négligeable de l'environnement sur l'activité de la protéine. L'activité sensible au vanadate mesurée dans les membranes d'*E. coli* ( $\sim 100 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$ , cf. fig. 33) et en détergent ( $\sim 200 \text{ nmol}/\text{min}/\text{mg}$ , cf. tableau 14) semblent cohérentes en supposant que Yhel/YheH après surexpression constitue  $\sim 50\%$  des protéines membranaires d'*E. coli*, estimation raisonnable d'après l'analyse sur SDS-PAGE des membranes (e.g. cf. fig. 33).

Au contraire, la forte augmentation d'activité détectée après reconstitution (de  $\sim 7$ -fois) pourrait indiquer que cet environnement lipidique stabilise une ou un ensemble de conformations du transporteur permettant un turnover catalytique plus efficace. En accord avec une restriction conformationnelle stimulant l'activité de Yhel/YheH, son activité de transport au sein des vésicules de membrane (cf. fig. 35B) et son activité ATPase en détergent (résultats non montrés) sont plus importantes à 30°C qu'à 37°C. L'influence de l'environnement a été également mise en évidence pour la glycoprotéine-P, dont l'activité ATPase est différemment stimulée par des substrats selon si la protéine se trouve en détergent ou reconstituée en protéoliposomes (Ambudkar *et al.* 1992; Ramachandra *et al.* 1998).

## Constantes cinétiques de l'hydrolyse de l'ATP par Yhel/YheH

Les constantes cinétiques de l'activité hydrolytique de Yhel/YheH ont été étudiées après reconstitution du transporteur dans les conditions mises au point précédemment. Après mesure de l'activité ATPase à des concentrations croissantes d'ATP, le traitement des données avec l'équation de Michaelis-Menten a permis de déterminer une vitesse maximale d'hydrolyse  $V_{\max}$  de 1,9  $\mu\text{mol/min/mg}$  ( $k_{\text{cat}}$  de 4,7  $\text{s}^{-1}$ ) et une constante  $K_M$  pour l'ATP de 1 mM (cf. fig. 53A). La représentation de Hanes-Woolf des données obtenues résulte en une forme de courbe caractéristique d'une liaison/hydrolyse d'ATP coopérative (cf. fig. 53B). Cette analyse étant réalisée à partir d'une seule expérience, les mesures doivent être répétées avant de pouvoir déterminer avec précision la valeur du coefficient de Hill.

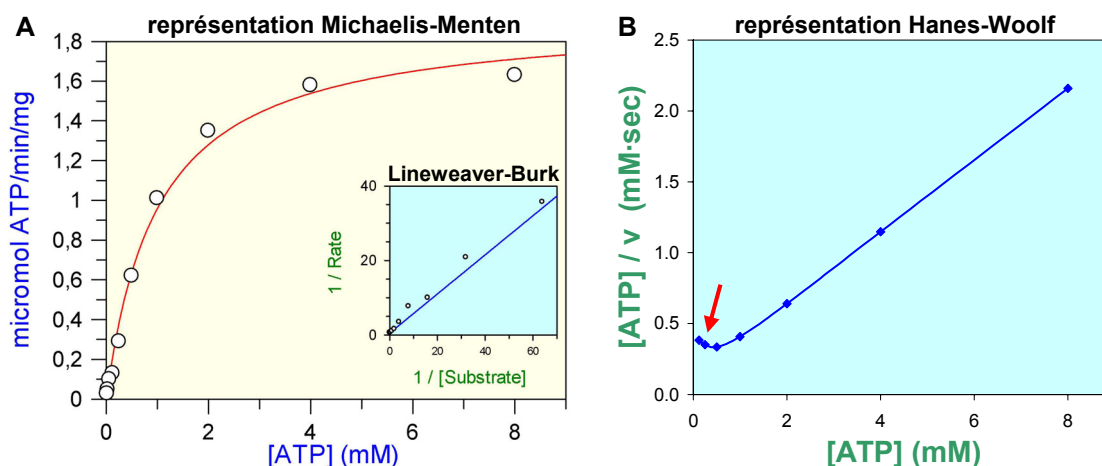
La vitesse maximale d'hydrolyse déterminée ici pour Yhel/YheH est du même ordre que celle mesurée pour la glycoprotéine-P reconstituée ( $\sim 1.8 \mu\text{mol/min/mg}$ ; Ramachandra *et al.* 1998), et supérieure à celle de MRP1 (0.5  $\mu\text{mol/min/mg}$ ; Chang *et al.* 1997) ou LmrA reconstitués (0.2  $\mu\text{mol/min/mg}$ ; Vigano *et al.* 2002). Cependant, la comparaison entre les différentes valeurs existantes dans la littérature se heurte à une forte variation expérimentale. Nous avons toutefois une valeur de référence dans le cas du transporteur BmrA de *B. subtilis*, qui a été surproduit, purifié et reconstitué dans des conditions similaires à celles employées dans ce travail. BmrA reconstitué possède une vitesse maximale d'hydrolyse de 6.5  $\mu\text{mol/min/mg}$ , qui est la valeur d'activité ATPase la plus élevée publiée jusqu'à cette date pour un transporteur ABC (Steinfels *et al.* 2004).

Dans le cas du transporteur Yhel/YheH, une activité ATPase plus faible est probable étant donnée la composition de ses sites nucléotidiques. Comme évoqué dans la partie « Rappels Bibliographiques », il a été montré pour plusieurs transporteurs ABC que le glutamate conservé qui suit le motif B de Walker serait le résidu catalytique responsable de l'hydrolyse de l'ATP vraisemblablement selon un mécanisme acide-base (cf. fig. 6). Ce glutamate, présent chez YheH, est remplacé par un aspartate dans Yhel (cf. tableau 15). Etant donné que la substitution du glutamate catalytique par un aspartate (E504D) chez l'homodimère BmrA entraîne la perte de l'activité ATPase du transporteur (Orelle *et al.* 2003), la présence d'un aspartate dans une des deux sous-unités du transporteur Yhel/YheH pourrait vraisemblablement rendre le site nucléotidique correspondant inactif (cf. discussion dans la section suivante).

Par ailleurs, nos données, bien que préliminaires, suggèrent que le transporteur Yhel/YheH hydrolyse l'ATP avec une coopérativité positive. Cette propriété a été mise en évidence pour les transporteurs de maltose (Davidson *et al.* 1996), d'histidine (Liu *et al.* 1997) et de multiples drogues BmrA (Steinfels *et al.* 2004), et signale vraisemblablement un couplage étroit entre les deux sous-unités composant les sites nucléotidiques. Une association étroite entre Yhel et YheH semblerait donc maintenue après purification et reconstitution.



**Figure 53. Détermination des constantes cinétiques de Yhel/YheH purifié et reconstitué.** L'activité ATPase des protéoliposomes contenant Yhel/YheH (préparés à un LPR 40 (w/w) avec PC/PA totalement solubilisés en DDM) a été mesurée à 37°C en dosant l'ADP produit par la réaction d'hydrolyse (cf. Matériels et Méthodes). Les données ont été traitées avec le logiciel GraFit 5 (*Erithacus*) selon l'équation de Michaelis-Menten (tracé rouge), obtenant les estimations suivantes pour les constantes cinétiques :  $V_{\max} = 1.93 \pm 0.08 \mu\text{mol/min/mg}$  ;  $K_M = 1.0 \pm 0.1 \text{ mM}$ . La représentation de Hanes-Woolf montre une déviation de la linéarité à des concentrations basses d'ATP (flèche rouge) témoignant d'une coopérativité positive.



Aussi, la coopérativité positive détectée ici pour le transporteur Yhel/YheH renforce l'observation faite sur l'association stable entre les deux sous-unités de l'hétérodimère purifié. Il faut noter que la coopérativité positive n'est pas incompatible avec un site non-hydrolytique au sein du transporteur Yhel/YheH, dans la mesure où la liaison du nucléotide est préservée. Dans ce sens, il a été montré pour les transporteurs TAP1/TAP2 et MRP1, dont l'un des NBDs possède comme Yhel un aspartate après le motif B de Walker (cf. tableau 15), que ce NBD est capable de lier l'ATP, voire même avec une meilleure affinité que l'autre NBD (Hou *et al.* 2000; Lapinski *et al.* 2001). De même, le mutant E504D de BmrA est capable de lier l'ATP (Orelle *et al.* 2003).

Concernant la constante  $K_M$ , la valeur déduite ici pour Yhel/YheH ( $\sim 1 \text{ mM}$ ) est du même ordre que les valeurs déterminées pour d'autres transporteurs, notamment  $0.4 - 1 \text{ mM}$  pour la glycoprotéine-P, (Romsicki *et al.* 1998; Lerner-Marmarosh *et al.* 1999),  $1.5 \text{ mM}$  pour BmrA (Steinfels *et al.* 2004) ou  $3 \text{ mM}$  pour MRP1 (Chang *et al.* 1997).

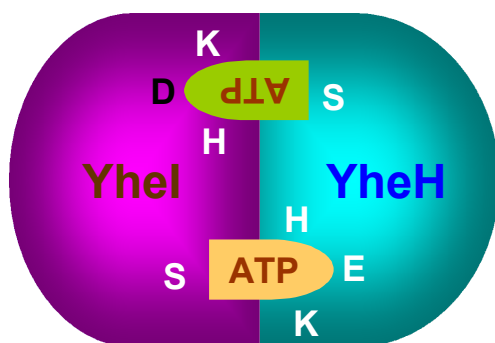
La caractérisation de l'activité ATPase de Yhel/YheH confirme ainsi que le transporteur est purifié sous une forme active et que sa conformation est vraisemblablement préservée tout au long du processus de purification/reconstitution. Afin de corroborer cette affirmation, des mesures de transport avec la protéine purifiée devront être réalisées, dans le but de vérifier le couplage entre les deux activités de Yhel/YheH.

## ETUDE DES MUTANTS CATALYTIQUES DE YHEI/YHEH

L'hydrolyse de l'ATP chez les transporteurs ABC repose sur la dimérisation des domaines nucléotidiques. Les motifs A et B de Walker et l'H-loop d'un NBD, entre autres résidus, sont complétés par la signature ABC de l'autre NBD résultant en deux sites de liaison/hydrolyse composites autour de deux molécules d'ATP (cf. fig. 3 et fig. 54). Chez les transporteurs qui possèdent deux NBDs égaux, ces motifs sont conformes aux consensus. En revanche, quelques divergences sont observées dans certains transporteurs, dont Yhel/YheH, où les deux NBDs ne sont pas identiques (cf. tableau 15). De plus, ces divergences n'apparaissent que dans un seul des deux sites nucléotidiques (composites). La question qui se pose alors concerne la symétrie entre les deux sites nucléotidiques d'un transporteur ABC: les deux sites sont-ils actifs, i.e. capables de lier et d'hydrolyser l'ATP ? Quel est le rôle de chacun des sites dans le fonctionnement du transporteur ? Nous avons abordé ces questions en prenant l'hétérodimère Yhel/YheH comme sujet d'étude et réalisé une mutagenèse dirigée sur les motifs Walker A, Walker B et H-loop de Yhel et de YheH.

	Walker A <b>GxxGxGKST</b>	Signature <b>LSGGQ</b>	Walker B <b>ΦΦΦΦDE</b>	H-loop <b>H</b>
Yhel	GKTGSGK <b>TT</b>	LSGGQ	ILIL <b>DD</b>	<b>H</b>
YheH	GHTGSGK <b>SS</b>	LSSGE	ILIL <b>DE</b>	<b>H</b>
BmrA	GPSGGGK <b>TT</b>	LSGGQ	ILML <b>DE</b>	<b>H</b>
LmrA	GPSGGGK <b>ST</b>	ISGGQ	ILML <b>DE</b>	<b>H</b>
Sav1866	GMSGGGK <b>ST</b>	LSGGQ	ILIL <b>DE</b>	<b>H</b>
LmrC	GATGAGK <b>ST</b>	FSGGQ	VLIL <b>DD</b>	<b>Q</b>
LmrD	GPTGSGK <b>TT</b>	FSVGQ	LLIL <b>DE</b>	<b>H</b>
TAP1	GPNGSGK <b>ST</b>	LSGGQ	VLIL <b>DD</b>	<b>Q</b>
TAP2	GPNGSGK <b>ST</b>	LAAGQ	VLIL <b>DE</b>	<b>H</b>
ABCG8	GSSGCG <b>AS</b>	LSGGE	ILIL <b>DE</b>	<b>H</b>
ABCG5	GSSGSGK <b>TT</b>	ISTGE	VMLF <b>DE</b>	<b>H</b>
MDR1_1	GNSGCGK <b>ST</b>	LSGGQ	ILLL <b>DE</b>	<b>H</b>
MDR1_2	GSSGCGK <b>ST</b>	LSGGQ	ILLL <b>DE</b>	<b>H</b>
MRP1_1	GQVGC <b>GKSS</b>	LSGGQ	IYLF <b>DD</b>	<b>H</b>
MRP1_2	GRTGAGK <b>SS</b>	LSVGQ	VLIL <b>DE</b>	<b>H</b>
CFTR_1	GSTGAGK <b>TS</b>	LSGGQ	LYLL <b>DS</b>	<b>S</b>
CFTR_2	GRTGSGK <b>ST</b>	LSHGH	ILLL <b>DE</b>	<b>H</b>
Pdr5_1	GRPGSG <b>CTT</b>	VSGGE	FQCW <b>DN</b>	<b>Y</b>
Pdr5_2	GASGAGK <b>TT</b>	LNVEQ	LVFL <b>DE</b>	<b>H</b>

**Tableau 15. Motifs conservés des domaines nucléotidiques : comparaison des séquences de différents transporteurs ABC.** BmrA, LmrA et Sav1866 forment des homodimères. LmrC/LmrD, TAP1/TAP2, ABCG5/ABCG8 sont des hétérodimères. MDR1, MRP1, CFTR et Pdr5 contiennent les deux domaines transmembranaires et les deux domaines nucléotidiques (« 1 » et « 2 » dans le tableau) fusionnés dans un seul polypeptide. Les transporteurs indiqués sont humains sauf Yhel/YheH et BmrA (*B. subtilis*), LmrA et LmrC/LmrD (*L. lactis*), Sav1866 (*S. aureus*) et Pdr5 (*S. cerevisiae*). Les consensus pour les différents motifs sont détaillés au-dessus, Φ indiquant un acide aminé hydrophobe et x un acide aminé quelconque. En noir sont signalés les résidus auxquels nous nous sommes intéressés dans ce travail (qui ont été mutés chez Yhel/YheH), dont en rouge les résidus non conformes au consensus.



**Figure 54. Représentation schématisée du dimère des NBDs de Yhel et de YheH contenant une molécule d'ATP dans chaque site composite.** Schéma établi à partir des structures tridimensionnelles obtenues pour d'autres transporteurs ABC (e.g. cf. fig. 3), montrant quelques résidus impliqués dans la liaison/hydrolyse du nucléotide. Sont représentés la lysine conservée du motif A de Walker (K), le carboxylate « catalytique » après le motif B de Walker (D ou E), l'histidine conservée de l'H-loop (H) et la signature ABC (S). Il est à noter que le glutamate canonique après le motif B de Walker est remplacé chez Yhel par un aspartate (signalé en noir).

### *Mutagenèse de la lysine conservée du motif A de Walker*

Le motif A de Walker ou *phosphate-binding loop* (*P-loop*) intervient dans la liaison de l'ATP via des interactions électrostatiques avec les phosphates  $\beta$  et  $\gamma$  du nucléotide (Saraste *et al.* 1990), la lysine conservée au sein de ce motif étant cruciale à l'hydrolyse chez les NTPases à *P-loop* (Senior *et al.* 1993; Smith *et al.* 1996), dont les transporteurs ABC (Schneider *et al.* 1998).

Nous avons choisi de remplacer dans le transporteur Yhel/YheH cette lysine conservée par une alanine dans une seule des sous-unités (résultant en Yhel K377A/YheH ou Yhel/YheH K469A), ainsi que dans les deux (double mutant Yhel K377A/YheH K469A). L'expression de ces mutants chez *E. coli* donne lieu à un niveau de protéine comparable à celui atteint avec la protéine sauvage, sauf pour le double mutant, qui est significativement moins présent dans la fraction membranaire (cf. fig. 55F). Cette observation a été confirmée sur trois préparations différentes de membranes (issues de trois cultures bactériennes). D'ailleurs, sur les 9 mutants étudiés dans ce travail, il représente le seul cas dont l'expression semble significativement affectée (cf. fig. 55F).

De façon intéressante, l'accumulation réduite du double mutant Yhel K377A/YheH K469A n'est pas l'effet cumulatif des deux mutations, puisque les simples mutants s'accumulent normalement dans la membrane. De même, la purification des simples mutants (Yhel K377A/YheH ou Yhel/YheH K469A) résulte en une protéine avec un profil de chromatographie d'exclusion de taille comparable à celui de la protéine sauvage, alors que le double mutant est polydisperse et sensiblement agrégé (cf. fig. 56A).

D'une part, ces résultats confirment que Yhel/YheH dans la membrane d'*E. coli* et après purification est un hétérodimère : dans le scénario où Yhel et YheH seraient dissociés ou associés sous forme d'homodimères, le double mutant aurait un phénotype cumulatif de celui des simples mutants. D'autre part, les observations faites sur ces mutants révèlent un rôle structural pour la lysine du motif A de Walker, sa mutation en alanine sur les deux sous-unités entraînant la déstabilisation du transporteur. Un rôle structural pour cette lysine a été mis en évidence dans le cas de deux protéines à *P-loop* n'appartenant pas à la famille ABC :

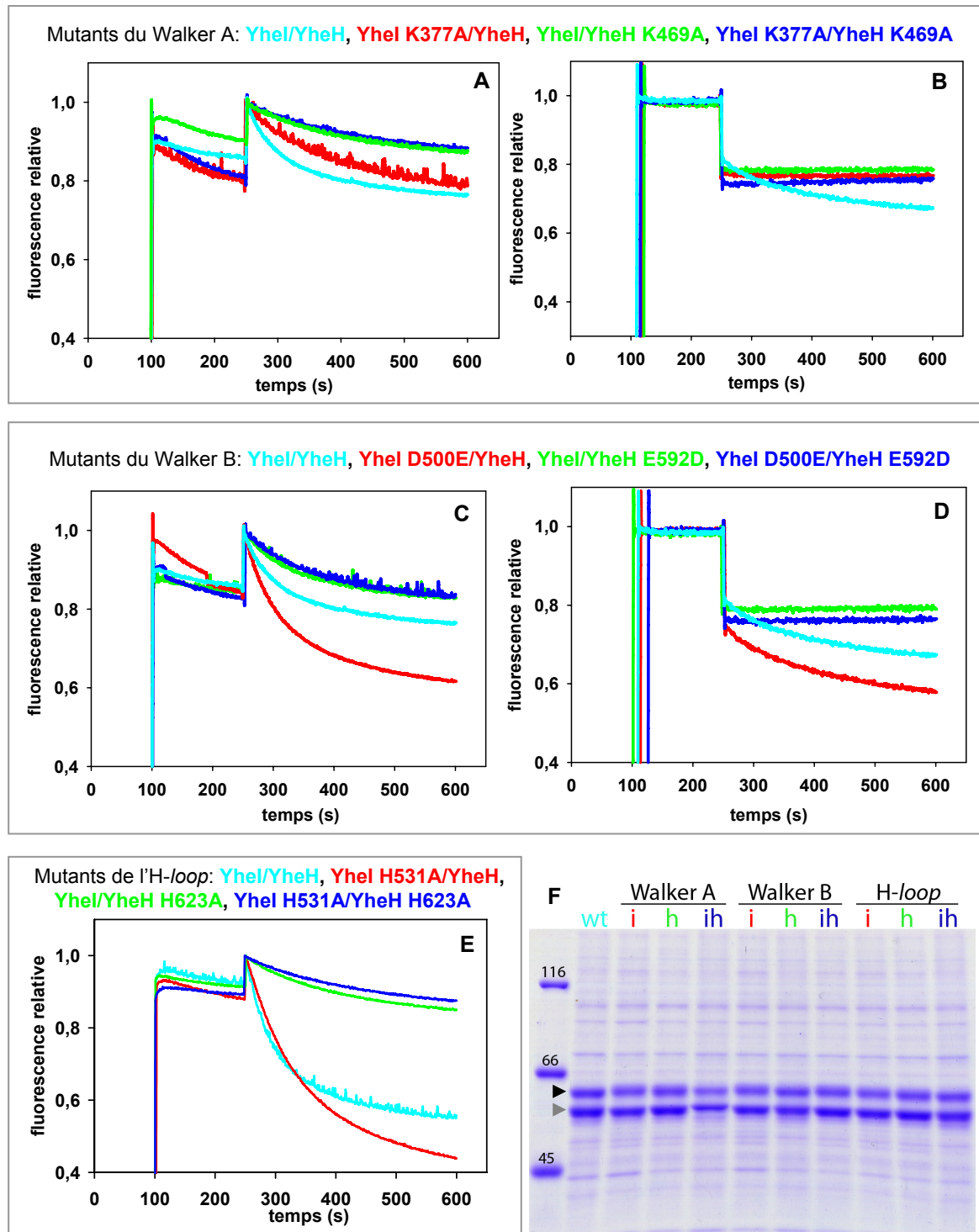
l'adénylate kinase (Reinstein *et al.* 1990) et la shikimate kinase (Krell *et al.* 2001).

L'analyse fonctionnelle des mutants lysine de Yhel/YheH montre qu'aucun ne possède une activité ATPase (cf. fig. 56D). La mutation équivalente chez BmrA (K380A) provoque également la perte de son activité ATPase, accompagnée d'une forte diminution de sa capacité de liaison du nucléotide (Orelle *et al.* 2008b). En revanche, les mutations K464A et K1250A (NBD N- et C-terminal, respectivement) sur CFTR ont des effets légèrement différents, réduisant respectivement à 15% et à 0% l'activité ATPase du canal (Ikuma *et al.* 2000), alors que la liaison de nucléotide ne semble pas affectée (Carson *et al.* 1995).

La capacité de transport de drogues des mutants lysine de Yhel/YheH a été ensuite examinée. De façon inattendue, le mutant Yhel K377A/YheH retient une certaine activité de transport du Hoechst 33342 (cf. fig. 55A) malgré l'absence d'activité ATPase observée. En revanche, sa capacité de transport de la doxorubicine est pratiquement abolie (cf. fig. 55B), ce qui suggère une différence mécanistique dans le transport de ces deux drogues. Au contraire de Yhel K377A/YheH, ni le mutant Yhel/YheH K469A ni le double mutant Yhel K377A/YheH K469A ne possèdent une activité de transport détectable (cf. fig. 55A,B). L'introduction de la mutation K469A abolit remarquablement l'activité de transport du Hoechst 33342 observée dans la protéine sauvage ou dans le simple mutant Yhel K377A/YheH, indiquant un effet dominant négatif de la mutation dans le NBD de YheH.

De façon comparable aux observations faites ici, la mutation K684M chez MRP1 (dans son NBD N-terminal ou NBD1) provoque une diminution de 70% du transport du leucotriène C<sub>4</sub>, alors que la mutation équivalente dans le NBD C-terminal (K1333M) abolit complètement ce transport (Gao *et al.* 2000). Dans ce transporteur, NBD1 semble lier l'ATP sans l'hydrolyser, alors que NBD2 serait hydrolytique (Hou *et al.* 2000). Comme le NBD1 de MRP1, le NBD de Yhel possède un aspartate à la place du glutamate catalytique qui suit le Walker B (cf. tableau 15), ce qui suggère que ce NBD pourrait ne pas être hydrolytique. Ceci expliquerait que la mutation K469A soit suffisante pour inactiver le transporteur (que ce soit en présence de Yhel sauvage ou du mutant K377A).

Dans ce scénario du NBD de Yhel non hydrolytique, pourquoi la mutation K377A sur ce NBD entraînerait une diminution du transport par Yhel/YheH? Il a été montré que le NBD1 de MRP1, bien que non hydrolytique, influence de manière allostérique le fonctionnement du NBD2, la liaison de nucléotide dans NBD1 stimulant fortement la liaison et l'hydrolyse de l'ATP dans NBD2 (Hou *et al.* 2002). De même, la mutation K377A sur Yhel, qui est censée réduire la liaison d'ATP dans ce NBD, pourrait diminuer la liaison/hydrolyse d'ATP par le NBD de YheH (ce qui est cohérent avec la coopérativité positive observée, cf. fig. 53B) et avoir ainsi un effet inhibiteur sur le transport. En effet, la protéine Yhel K377A/YheH purifiée ne possède aucune activité ATPase détectable (cf. fig. 56D). Aussi semblerait-il que les deux NBDs de Yhel/YheH dussent être capables de lier le nucléotide pour que le transporteur puisse hydrolyser l'ATP.



**Figure 55. Transport de drogues par les mutants catalytiques de YheI/YheH.** 100  $\mu$ g (A-D) ou 200  $\mu$ g (E) de vésicules de membrane inversées contenant YheI/YheH sauvage ou muté ont été incubées à 30°C pendant 100 secondes avant d'ajouter 1  $\mu$ M Hoechst 33342 (A,C,E) ou 10  $\mu$ M doxorubicine (B,D). Le transport de la drogue est déclenché par l'addition de 2 mM ATP à  $t = 250$  s. Le transport de la doxorubicine par les mutants de l'H-loop n'a pas été étudié. F : Gel à 9% polyacrylamide coloré au bleu de Coomassie montrant les vésicules de membranes qui contiennent YheI/YheH sauvage (wt) ou les simples (i,h) ou doubles mutants (ih) des différents motifs conservés (Walker A, Walker B, H-loop). 3  $\mu$ g de protéines membranaires ont été déposés par piste. Flèche noire : YheH ; flèche grise : YheI. Marqueurs de poids moléculaire en kDa.

Comment un transporteur hydrolytiquement inactif peut soutenir une activité de transport reste cependant à éclaircir. Il est possible que la liaison de nucléotide dans le NBD de YheH soit suffisante pour énergiser le transport du Hoechst 33342, tandis que celui de la doxorubicine nécessiterait l'hydrolyse. Dans le cas du transporteur ABCG5/ABCG8, la mutation K93R sur ABCG5 semble inhiber le transport du cholestérol, alors que celui des stérols végétaux n'est pas affecté (Zhang *et al.* 2006). De même, une mutation catalytique (impliquant l'histidine de l'H-loop) sur Pdr5 affecte inégalement le transport de différentes drogues (Ernst *et al.* 2008).

Même si ces interprétations nécessitent d'être vérifiées en étudiant la liaison/hydrolyse de l'ATP par chacun des NBDs de Yhel/YheH, nos résultats concernant l'activité de transport de Hoechst 33342 par les différents mutants lysine révèlent une asymétrie fonctionnelle du transporteur Yhel/YheH et rejoignent les différences mises en évidence entre les deux NBDs de certains transporteurs ABC de la sous-famille ABCC, tels que MRP1, SUR1 et CFTR (Ueda *et al.* 1997; Szabo *et al.* 1999; Hou *et al.* 2000).

### *Mutagenèse de l'histidine conservée de l'H-loop*

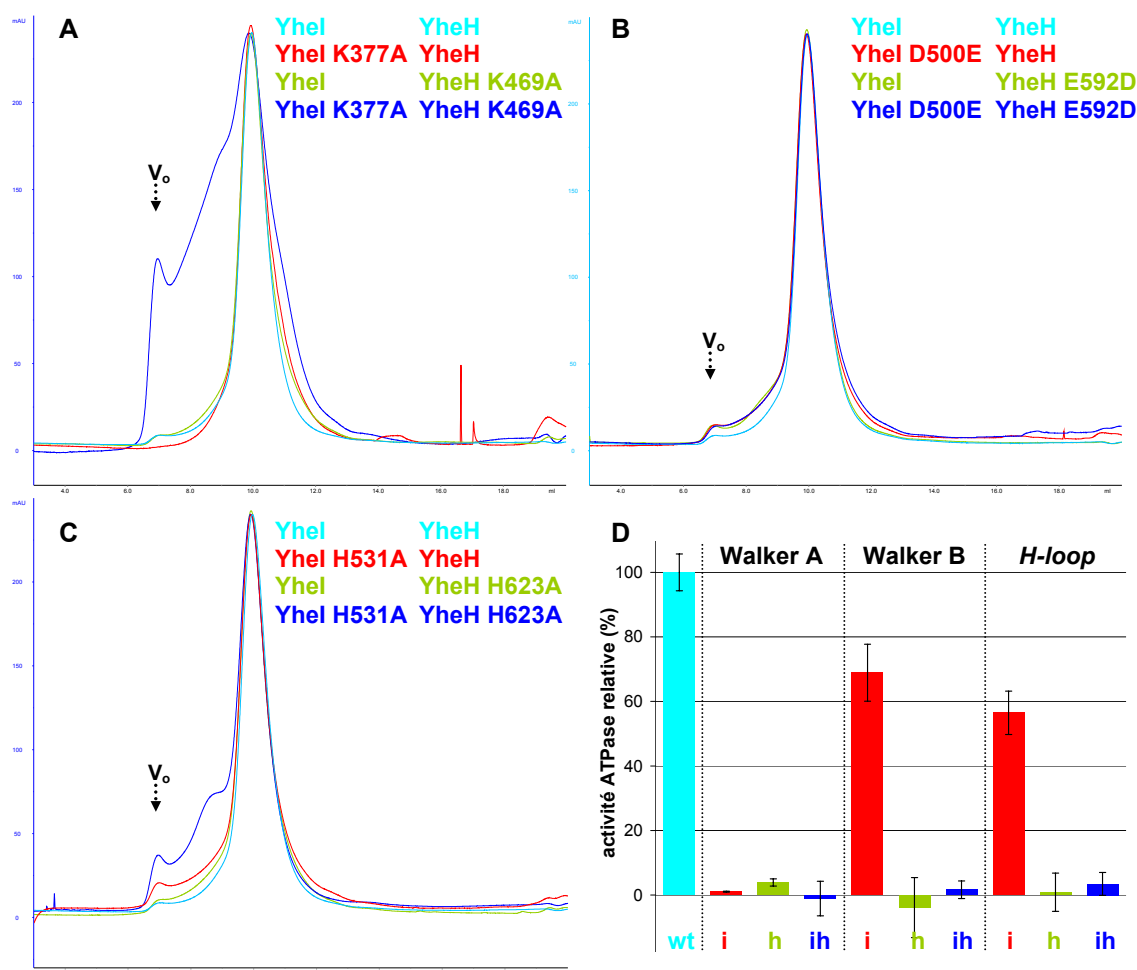
Des travaux pionniers sur le transporteur de maltose et d'histidine ont montré biochimiquement l'implication de l'histidine conservée de l'H-loop dans le mécanisme fonctionnel des transporteurs ABC, la mutation de ce résidu conduisant dans les deux cas à l'abolition de l'activité de transport (Shyamala *et al.* 1991; Davidson *et al.* 1997). Plus récemment, le rôle de ce résidu a été étudié dans le NBD du transporteur de l'hémolysine, dont l'activité ATPase est totalement abolie par la mutation H662A, tandis qu'un mutant du glutamate dit catalytique conserve 10% de l'activité ATPase de HlyB (Zaitseva *et al.* 2005b). Ces auteurs ont alors proposé un rôle de dyade catalytique pour le glutamate et l'histidine (cf. fig. 6).

Ce concept a été corroboré pour le NBD isolé de TAP1, qui possède des résidus non canoniques dans ces deux positions (aspartate et glutamine, cf. tableau 15). La mutation de l'aspartate après le motif B de Walker en glutamate n'augmente l'activité ATPase du NBD que si la glutamine est remplacée par l'histidine du consensus (Ernst *et al.* 2006; Procko *et al.* 2006). En revanche, la mutation de cette histidine en glutamine dans le NBD de TAP2 ne modifie pas l'activité de translocation de peptides du transporteur entier TAP1/TAP2 (Procko *et al.* 2006). De même, la mutation de l'histidine du NBD2 du transporteur Pdr5 n'a aucune conséquence sur l'activité ATPase de ce transporteur (Ernst *et al.* 2008). Ces exemples montrent que le rôle de l'histidine de l'H-loop n'est pas encore établi et pourrait être différent selon le transporteur.

Nous avons étudié ici l'effet de la substitution dans le transporteur Yhel/YheH de cette histidine conservée par une alanine dans une seule des sous-unités (résultant en Yhel H531A/YheH ou Yhel/YheH H623A) ou dans les deux (double mutant Yhel H531A/YheH H623A). Comme montré dans la figure 55F, l'introduction de ces mutations ne modifie pas

l'expression de la protéine. De même, l'état d'oligomérisation et d'agrégation des protéines mutées purifiées d'après leur profil de chromatographie d'exclusion de taille est comparable à celui de la protéine sauvage (excepté une légère agrégation chez le double mutant ; cf. fig. 56C).

L'analyse fonctionnelle de ces mutants de YheI/YheH montre que la mutation de l'histidine de YheH (H623A) abolit à la fois l'activité ATPase et le transport de Hoechst 33342 par YheI/YheH (cf. fig. 56D et 55E). Au contraire de Pdr5 et TAP1/TAP2, l'histidine de l'H-loop du NBD2 (NBD de YheH) semble jouer un rôle majeur dans le mécanisme catalytique de YheI/YheH. La mutation de l'histidine du NBD de YheI n'a en revanche pas les mêmes conséquences : l'activité ATPase du simple mutant YheI H531A/YheH n'est diminuée que de ~40% par rapport à la protéine sauvage (cf. fig. 56D), et la vitesse du transport de Hoechst 33342 ne semble pas affectée (cf. fig. 55E). L'allure de la courbe de transport est néanmoins modifiée, le plateau de fluorescence étant atteint plus tard que pour la protéine sauvage.



**Figure 56. Analyse des mutants catalytiques de YheI/YheH purifiés.** Chromatographie d'exclusion de taille de YheI/YheH purifié portant des mutations dans le motif A de Walker (**A**), le motif B de Walker (**B**) ou l'H-loop (**C**). 150-400 µg de protéine ont été injectés dans une colonne Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) et élués dans 50 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoéthanol, 10% (v/v) glycérol et 0.05% (w/v) DDM.  $V_0$  : volume mort. **D** : Activité ATPase de YheI/YheH sauvage (wt), simples (i,h) ou doubles mutants (ih) des différents motifs conservés (Walker A, Walker B, H-loop), purifiés par chromatographie d'affinité sur  $\text{Ni}^{2+}$ -agarose et reconstitués en protéoliposomes.

Nonobstant l'essentialité observée de l'histidine H623 de YheH pour l'activité ATPase, l'absence putative d'hydrolyse dans le NBD de YheI suggérée auparavant impliquerait un phénotype neutre pour la mutation H531A dans le NBD de YheI (de toute façon non hydrolytique). Or, la mutation H531A entraîne une réduction de 40% de l'activité ATPase du transporteur. Une affinité réduite du NBD de YheI pour le nucléotide pourrait provoquer de façon allostérique une perte d'activité ATPase sur le NBD de YheH, comme discuté précédemment. Néanmoins, dans le cas du NBD de HlyB, aucun effet de la mutation H662A n'a été observé sur la liaison de nucléotide (Benabdelhak *et al.* 2005). Cependant, le comportement du NBD isolé pourrait ne pas être directement transposable au transporteur entier.

L'étude des mutants histidine de YheI/YheH corrobore les observations faites à propos des mutants lysine : (i) l'effet de la mutation n'est pas identique en fonction du NBD affecté, soulignant la non équivalence des NBDs de YheI et YheH ; (ii) la mutation du NBD de YheH a un effet dominant négatif, l'introduction de la mutation H623A abolissant l'activité ATPase et de transport observée pour YheI H531A/YheH ou YheI/YheH sauvage.

### *Mutagenèse du carboxylate « catalytique »*

La comparaison des motifs conservés de YheI et YheH révèle un résidu différent immédiatement après le motif B de Walker (D chez YheI et E chez YheH, cf. fig. 54). Comme discuté précédemment, un rôle catalytique pour le glutamate dans cette position a été démontré chez le transporteur BmrA (Orelle *et al.* 2003), ainsi que chez les NBDs MJ0796 et MJ1267 (Moody *et al.* 2002). Ce glutamate agirait en tant que base catalytique dans un mécanisme d'hydrolyse de type acide-base (cf. fig. 6). De façon remarquable, ce glutamate n'est pas nécessairement conservé du moment où les deux NBDs d'un transporteur ne sont pas identiques (cf. tableau 15). Dans ce cas, la présence d'un aspartate dans cette position (comme retrouvé chez YheI) semblerait tolérée, voire sélectionnée positivement. Notamment chez ABCG5/ABCG8, qui possède un glutamate dans les deux NBDs (cf. tableau 15), l'introduction d'un aspartate dans le NBD de ABCG8 (équivalent du NBD1) ne diminue pas son activité de transport (Zhang *et al.* 2006). En revanche, la présence d'un aspartate dans les deux NBDs d'un transporteur n'est retrouvée dans aucun cas, indiquant qu'au moins un glutamate dans un des deux NBDs serait indispensable à la fonctionnalité du transporteur. Ainsi, la mutation E504D chez l'homodimère BmrA abolit son activité ATPase et de transport (Orelle *et al.* 2003).

Dans ce travail, nous avons étudié les conséquences du remplacement de l'aspartate de YheI par un glutamate (YheI D500E) et celles d'effectuer le changement inverse dans YheH (E592D). Les trois mutants ainsi générés (simples mutants YheI D500E/YheH et YheI/YheH E592D, et double mutant YheI D500E/YheH E592D) s'expriment de façon comparable à la protéine sauvage (cf. fig. 55F), et les protéines purifiées sont presque indistinguables de la protéine sauvage par chromatographie d'exclusion de taille (cf. fig. 56B). La mutation du glutamate de YheH (E592D) abolit totalement l'activité ATPase et de transport (cf. fig. 56D et



55C,D), suggérant que le glutamate E592 constitue la base catalytique de Yhel/YheH ou, comme discuté dans la section précédente, forme une dyade catalytique avec l'histidine 623 de l'H-loop, résidu qui s'est avéré essentiel à l'hydrolyse. Nos résultats montrent également que la position de ce glutamate catalytique n'est pas interchangeable entre les deux NBDs du transporteur, le mutant Yhel D500E/YheH E592D étant notamment inactif. La même conclusion a été tirée de l'étude du transporteur MRP1 (Payen *et al.* 2003).

Le phénotype du mutant Yhel D500E/YheH est plus complexe : alors que l'activité ATPase du transporteur purifié est ~30% inférieure à celle de la protéine sauvage (cf. fig. 56D), son activité de transport de drogues est augmentée (cf. fig. 55C,D). Ce résultat suggère d'abord que, si le NBD de Yhel n'est pas hydrolytique, la présence d'un aspartate à la place du glutamate conservé n'en est pas responsable. L'introduction du glutamate « canonique » dans cette position ne conduit pas à une augmentation de l'activité ATPase du transporteur; au contraire, elle est diminuée de 30%. Cet effet semble d'autant plus difficile à expliquer que la mutation analogue chez MRP1 augmente aussi bien l'hydrolyse (Payen *et al.* 2003) que le transport (Yang *et al.* 2005).

Comment Yhel D500E/YheH peut transporter des substrats plus efficacement sans augmenter la vitesse d'hydrolyse ? Etant donné que l'activité ATPase a été mesurée en absence de substrat (cf. fig. 56D), il est concevable que la présence de drogue puisse stimuler l'hydrolyse de façon plus prononcée chez le mutant Yhel D500E/YheH que chez la protéine sauvage (dont la stimulation de l'activité ATPase par le Hoechst 33342 a été observée en détergent, cf. fig. 46). Un possible effet de la mutation D500E serait la modulation de l'affinité du transporteur pour la drogue. En accord avec cette hypothèse, différents mutants du même aspartate chez MRP1 possèdent des valeurs de  $K_M$  modifiées pour le leucotriène (Yang *et al.* 2005). Alternativement, la mutation D500E pourrait favoriser la dissociation des domaines nucléotidiques suite à la translocation de la drogue et accélérer ainsi le cycle de transport/hydrolyse. Ceci impliquerait néanmoins que l'état posthydrolytique en présence de substrat est différent de celui qu'on retrouve en protéoliposomes en absence de substrat.

Finalement, même si la mutation D500E dans le NBD de Yhel induit une augmentation du transport, cet effet est annulé par la mutation E592D dans le NBD de YheH, confirmant que l'hydrolyse dans ce NBD est indispensable à l'activité du transporteur, comme déjà observé dans le cas des mutants lysine et histidine. Afin de mieux cerner les rôles respectifs du NBD de Yhel et du NBD de YheH, il faudrait mesurer l'affinité de ces NBDs pour les nucléotides, ainsi que leur capacité à hydrolyser l'ATP, et ceci en absence et en présence de substrat.

En conclusion, toutes les mutations réalisées ici dans le NBD de YheH abolissent la fonctionnalité du transporteur Yhel/YheH. Au contraire, parmi les résidus mutés dans le NBD de Yhel, seule la lysine du motif A de Walker est essentielle à l'activité du transporteur (au moins à l'hydrolyse de l'ATP), suggérant que la liaison du nucléotide dans ce NBD est nécessaire au fonctionnement de Yhel/YheH. De plus, nos résultats mettent en évidence un rôle structural pour cette lysine, sa mutation dans Yhel et YheH entraînant la déstabilisation du transporteur.



# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES





Les protéines Yhel et YheH de *Bacillus subtilis* forment un nouveau transporteur de multiples drogues, le premier hétérodimère ABC de cette bactérie caractérisé au niveau moléculaire. Le transporteur Yhel/YheH peut être exprimé chez *Escherichia coli* avec un rendement élevé et sous forme active, permettant de préparer des vésicules de membranes inversées fortement enrichies en cette protéine et d'étudier le transport de plusieurs drogues fluorescentes. Au moins quatre substrats de Yhel/YheH ont pu être identifiés, faisant partie des drogues précédemment caractérisées comme substrats de transporteurs MDR.

L'étude de *B. subtilis* sauvage et du mutant de délétion  $\Delta yhel/yheH$  n'a révélé aucune différence de sensibilité entre ces deux souches face à une dizaine d'antibiotiques différents. Chez *Lactococcus lactis* et *Streptococcus pneumoniae*, deux transporteurs ABC hétérodimériques ont été identifiés comme acteurs majeurs de la résistance de ces espèces bactériennes aux drogues, mais ces hétérodimères ne sont pas des orthologues de Yhel/YheH. Le trait phénotypique de Yhel/YheH le plus marquant décrit jusqu'à présent est sa forte induction transcriptionnelle en présence de plus de 30 antibiotiques différents, la plupart d'entre eux ciblant le ribosome. Le fait que la réponse stringente et le défaut de maturation ribosomique induisent également l'expression du transporteur suggère un rôle pour Yhel/YheH dans la réponse cellulaire au stress, potentiellement différent de l'efflux d'antibiotiques. De plus, cette fonction semblerait être conservée, puisque, comme observé pour Yhel/YheH, l'expression de son homologue chez *Enterococcus faecalis* est induite en présence d'antibiotiques.

La purification de l'hétérodimère Yhel/YheH a été mise au point, aboutissant à un rendement par litre de culture de plus de 10 mg de protéine, sous forme stable et active. La reconstitution de la protéine a également été optimisée et une activité ATPase basale de 2  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  ( $k_{\text{cat}} \sim 5 \text{ s}^{-1}$ ) déterminée pour Yhel/YheH en protéoliposomes. La stabilité du transporteur purifié, et notamment celle de l'association de ses deux sous-unités, a permis la cristallisation de Yhel/YheH en deux dimensions par le groupe du Dr. Daniel Lévy (Institut Curie, Paris). Des tentatives de cristallisation du transporteur en trois dimensions devraient bientôt commencer, encouragées par ces résultats.

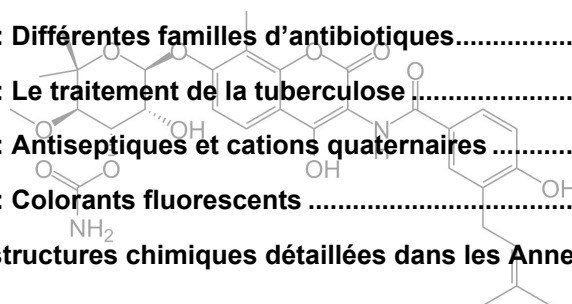
Enfin, une étude a été amorcée sur le mécanisme catalytique de YheI/YheH, visant à comprendre le rôle des domaines nucléotidiques dans le fonctionnement du transporteur. D'une part, nous avons identifié une contribution inattendue de la lysine conservée de la P-loop à la stabilité du transporteur, qui sera étudiée plus en détail par ultracentrifugation analytique (expériences en cours) et par des mesures de stabilité thermique. D'autre part, et en accord avec des observations faites sur les transporteurs ABC humains MRP1, CFTR ou TAP1/TAP2, les domaines nucléotidiques de YheI et de YheH se sont avérés être non équivalents. Ce constat fait apparaître cette protéine comme un bon modèle d'étude pour approfondir la compréhension du fonctionnement de certains transporteurs ABC présents chez les eucaryotes. De plus, les différents mutants hydrolytiquement inactifs obtenus au cours de cette étude pourront être utiles à des fins structurales.

Au-delà d'une étude cellulaire plus détaillée dans le but de cerner la fonction physiologique du transporteur, la création de fusions génétiques entre YheI et YheH pourrait être une perspective intéressante à ce travail. Cette approche, qui a par ailleurs permis d'obtenir des dimères covalents actifs des transporteurs ABCG2 et EmrE, viserait d'une part à mimer et tenter de comprendre la tendance évolutive observée chez les eucaryotes, et d'autre part à générer une association stable entre les deux sous-unités du transporteur YheI/YheH qui pourrait par exemple faciliter sa cristallisation.

En ce qui concerne le transporteur Rv1747 de *Mycobacterium tuberculosis*, des modifications devront être introduites dans la stratégie d'expression pour pallier les arrêts traductionnels mis en évidence chez *E. coli*, avant d'envisager la caractérisation de ce transporteur de fonction inconnue. Après les différentes stratégies mises en place dans ce travail, deux pistes seraient à explorer : la synthèse d'un gène avec optimisation des codons pour *E. coli* ou l'utilisation d'un hôte d'expression différent, tels que les levures *Pichia pastoris* ou *Saccharomyces cerevisiae*, qui sont de plus en plus utilisées pour l'expression de protéines ABC humaines. Alternativement, la purification du transporteur portant une étiquette polyhistidine C-terminale semble une stratégie raisonnable d'après le niveau d'expression obtenu dans ce travail. En supposant que la conformation de la protéine ne soit pas déstabilisée lors de la purification, cette approche pourrait permettre d'estimer si la protéine de taille entière est synthétisée sous forme active chez *E. coli* avant de choisir un hôte différent pour son expression.

# ANNEXES

<b>Annexe A : Différentes familles d'antibiotiques.....</b>	<b>187</b>
<b>Annexe B : Le traitement de la tuberculose .....</b>	<b>193</b>
<b>Annexe C : Antiseptiques et cations quaternaires .....</b>	<b>195</b>
<b>Annexe D : Colorants fluorescents .....</b>	<b>196</b>
<b>Liste des structures chimiques détaillées dans les Annexes A-D....</b>	<b>197</b>







## ANNEXE A : DIFFERENTES FAMILLES D'ANTIBIOTIQUES

**Tableau S1 : Quelques familles d'antimicrobiens<sup>23</sup> et anticancéreux**

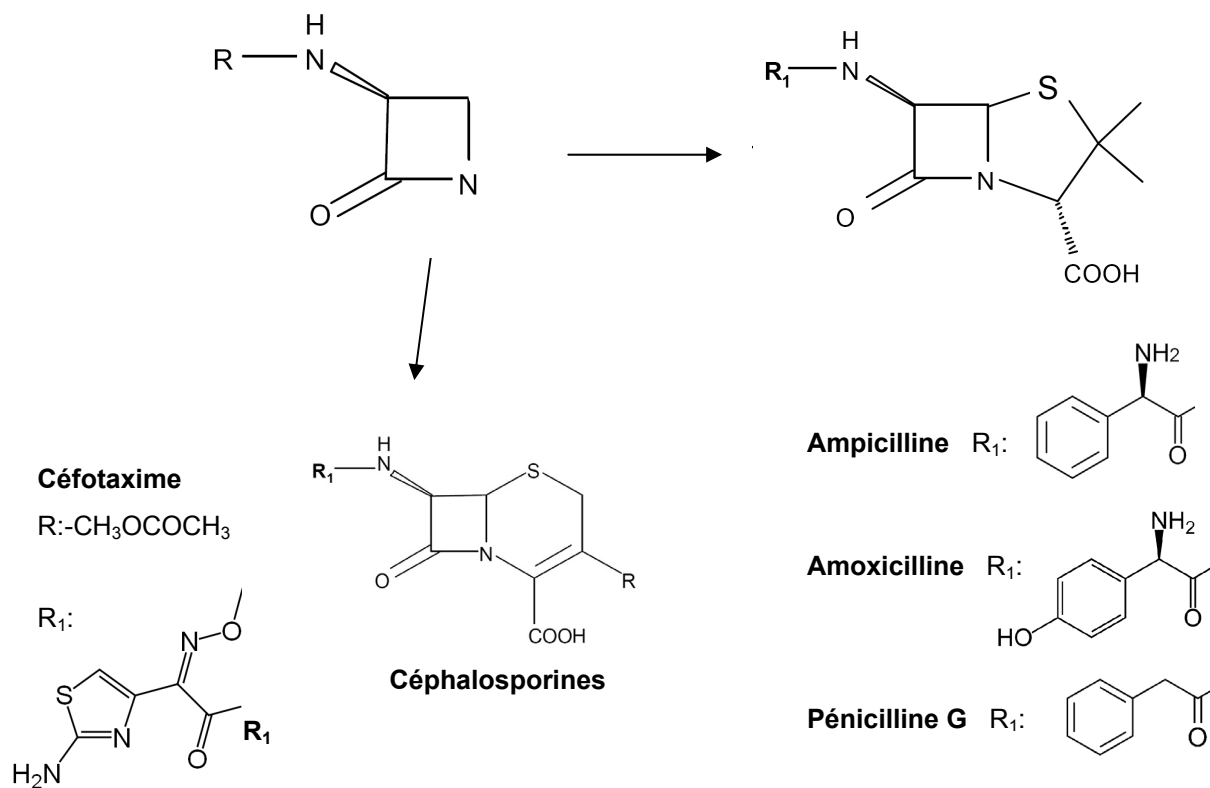
Mécanisme d'action (fonction inhibée)	Famille	Date de découverte
I. Synthèse de la paroi cellulaire	β-Lactames	1940' (pénicillines) 1953 (céphalosporines 4 <sup>ème</sup> génération)
	Glycopeptides	1958 (vancomycine)
II. Synthèse d'ADN	Aminocoumarins	1955 (novobiocine)
	Anthracènediones	1970' (mitoxantrone)
	Anthracyclines	1963
	Fluoroquinolones	1970'
	Quinolones	1962 (ac. nalidixique)
III. Synthèse protéique	Aminocyclitols	1961 (spectinomycine)
	Aminoglycosides	1957
	Aminonucléosides	1950' (puromycine)
	Chloramphénicol	1949
	MLS (macrolides, streptogramines, lincosamides)	1950 (erythromycine) 1992 (synercid <sup>24</sup> )
	Oxazolidonones	1966 (clindamycine)
	Tétracyclines	1987 (linézolide)
		1953
IV. Inconnu	Berbérine (alcaloïde antifongique/antibactérien)	1840
	Pentamidine (antiparasitaire)	1938

<sup>23</sup> Plusieurs définitions existent pour les termes antimicrobien et antibiotique. Selon l'étymologie, un antimicrobien est un composé qui tue ou prévient la croissance de microbes (i.e. bactéries, fungi ou virus). Souvent, ce terme est utilisé pour dénommer des composés synthétiques avec une activité antimicrobienne ; par opposition aux antibiotiques, qui sont définis comme des produits synthétisés par des microorganismes, capables de tuer ou inhiber la croissance d'autres organismes.

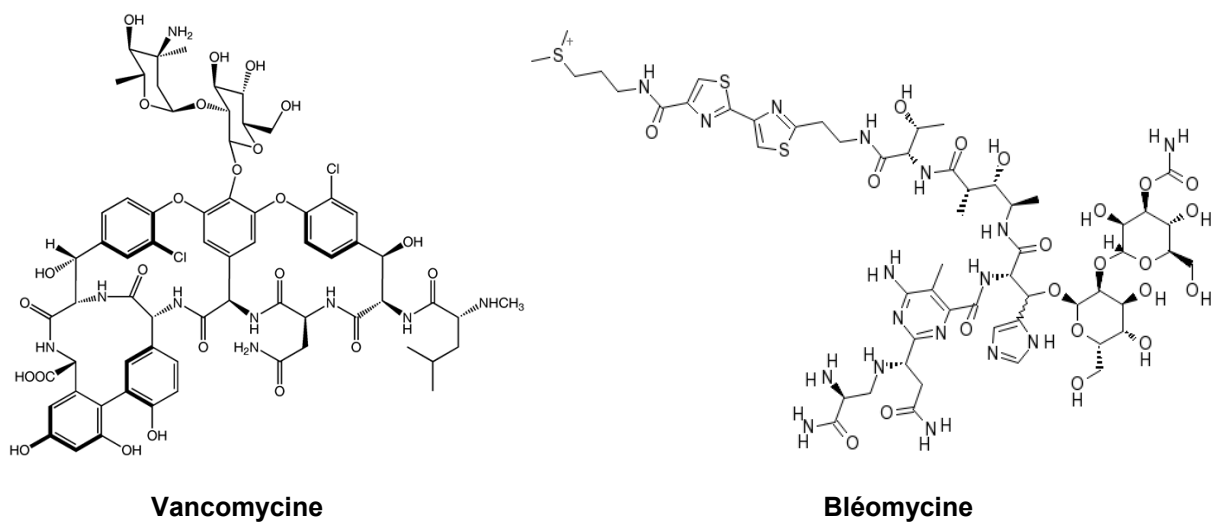
<sup>24</sup> Synercid est le nom commercial (*Aventis*) d'un mélange de dalfopriline et quinupristine 7:3 (w/w) (antibiotiques appartenant aux streptogramines A et B, respectivement)

## I. ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE DE LA PAROI CELLULAIRE

## Famille des $\beta$ -Lactames

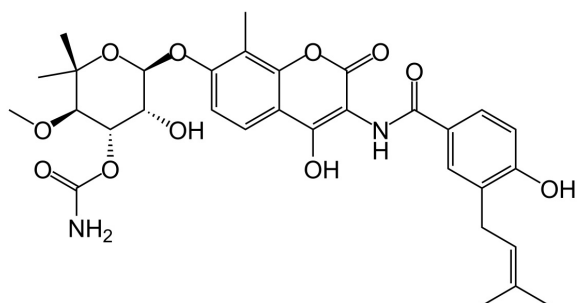


## Famille des glycopeptides



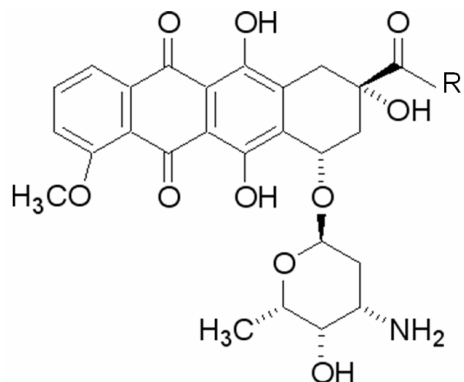
## II. ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE D'ADN

## Famille des aminocoumarins

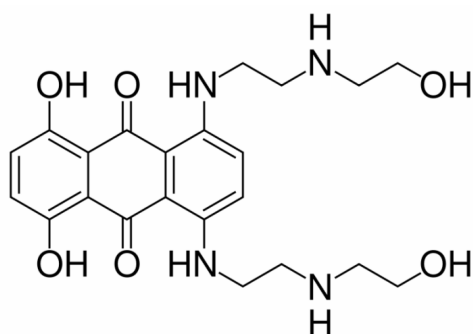


Novobiocine

## Famille des anthracyclines

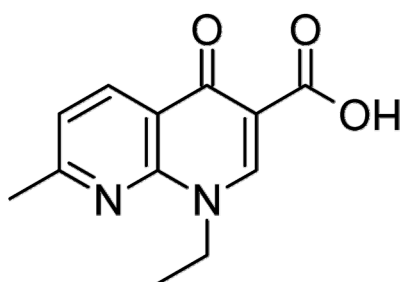
Doxorubicine R : CH<sub>2</sub>OHDaunorubicine R : CH<sub>3</sub>

## Famille des anthracènediones

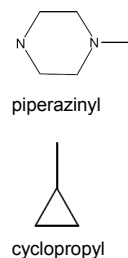
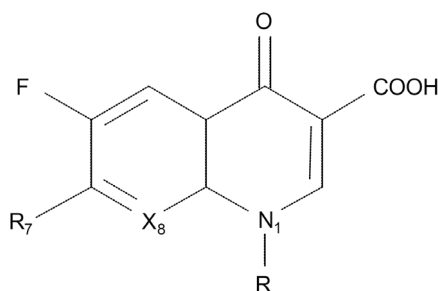


Mitoxantrone

## Famille des (fluoro)quinolones



Acide nalidixique (quinolone)

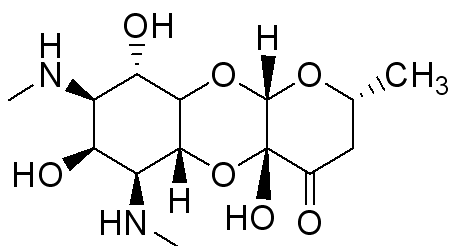


Fluoroquinolones

	R	R <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>
Ciprofloxacin	cyclopropyl (c-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> )	piperazinyl	CH <sub>2</sub>
Gatifloxacin	cyclopropyl (c-C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> )	methyl-piperazinyl	-O-CH <sub>3</sub>
Norfloxacin	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	piperazinyl	CH <sub>2</sub>

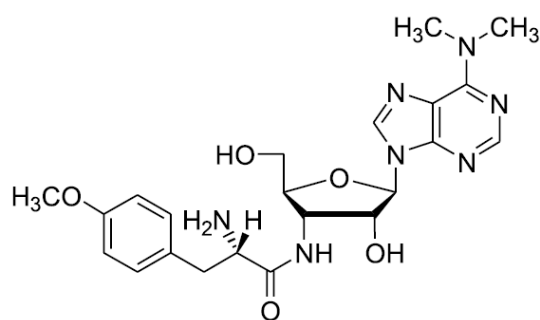
### III. ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE (i)

#### Famille des aminocyclitols



**Spectinomycine**

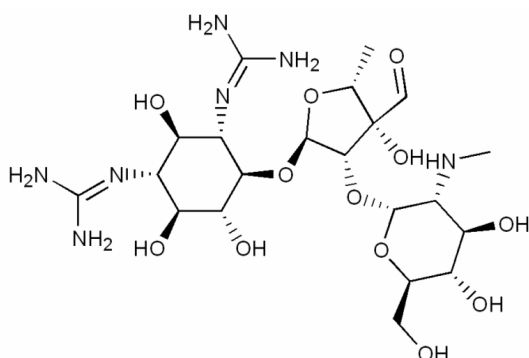
#### Famille des aminonucléosides



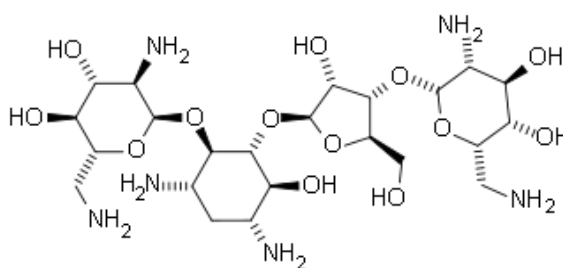
**Puromycine**

#### Famille des aminoglycosides

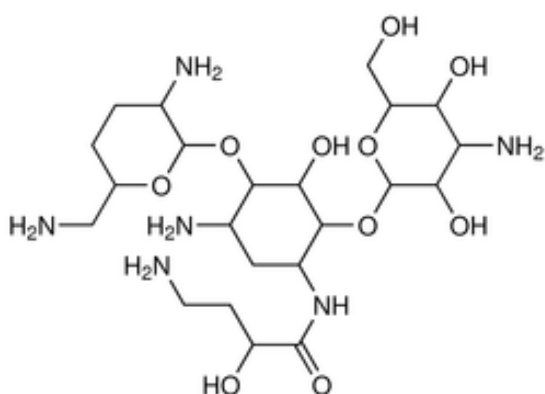
##### Streptomycine



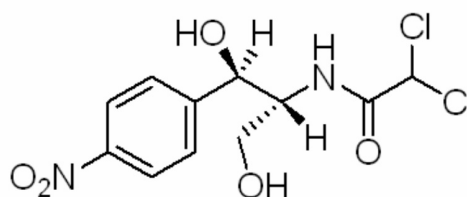
##### Néomycine



##### Arbékacine



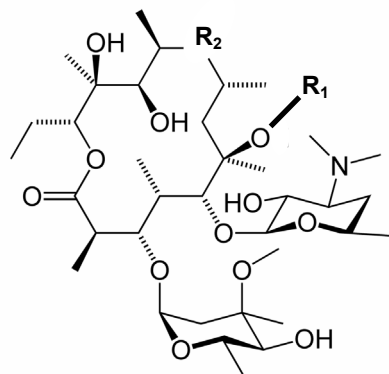
#### Chloramphénicol



### III. ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE (ii)

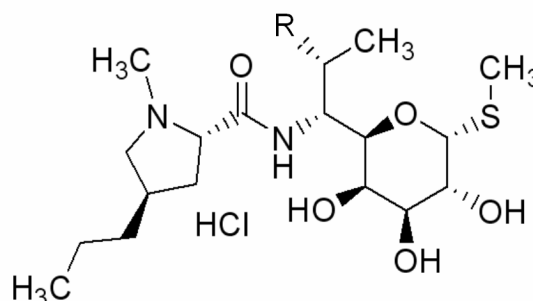
#### LES ANTIBIOTIQUES MLS (MACROLIDES, LINCOSAMIDES, STREPTOGRAMINES)

##### Famille des macrolides



	Atomes de C dans l'anneau lactone	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Azithromycine	15	H	-NCH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -
Erythromycine	14	H	CO
Clarithromycine	14	CH <sub>3</sub>	CO

##### Famille des lincosamides

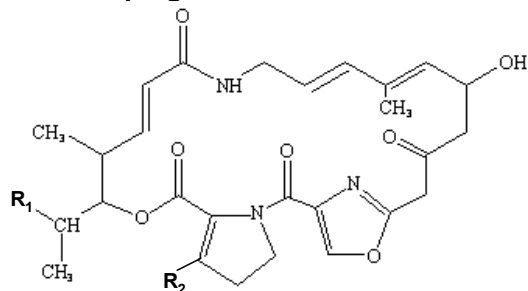


Lincomycine R: OH

Clindamycine R: Cl

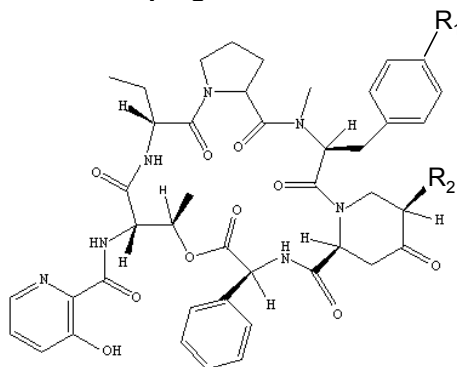
##### Famille des streptogramines

##### Streptogramines A



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Streptogramine A (Virginiamycine M1, Pristinamycine IIA)	CH <sub>3</sub>	H
Dalfopristine	H	SO <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CHN(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>

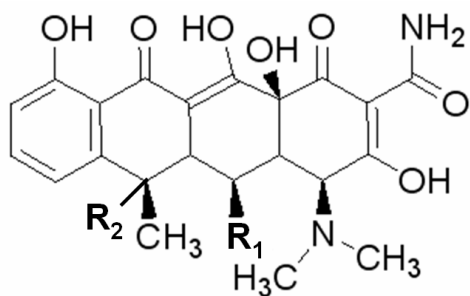
##### Streptogramines B



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Streptogramine B (Pristinamycine IA)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
Quinupristine	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	
Virginiamycine S	H	H

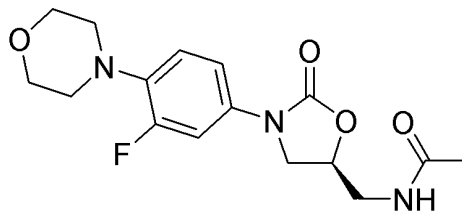
## III. ANTIBIOTIQUES INHIBANT LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE (iii)

## Famille des tétracyclines



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Tétracycline	H	OH
Doxocycline	OH	H

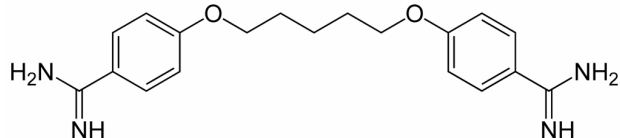
## Famille des oxazolidinones



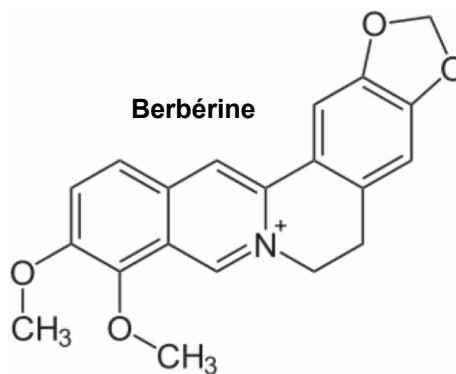
Linézolide

## IV. ANTIBIOTIQUES DE FONCTION INCONNUE

Pentamidine



Berbérine



## ANNEXE B : LE TRAITEMENT DE LA TUBERCULOSE

Depuis plus de 50 ans, la tuberculose est traitée par une thérapie combinée car (i) le traitement avec un seul antimycobactérien aboutit rapidement au développement de résistance chez *Mycobacterium* ; (ii) les antibiotiques utilisés possédant différents modes d'action, leur utilisation combinée peut entraîner une synergie qui augmente les probabilités de succès de la thérapie.

Le traitement préconisé pour la tuberculose dépend du stade de la maladie (active ou latente). Le traitement standard "court" pour la tuberculose active comporte une combinaison d'antibiotiques "de première ligne" (cf. tableau S2) selon le protocole suivant: isoniazide, rifampicine, pyrazinamide et éthambutol pendant deux mois, puis isoniazide et rifampicine pendant quatre mois. Le patient est considéré guéri après six mois (toutefois, le risque d'une rechute est de 2-3%). Pour la tuberculose latente, le traitement standard consiste en l'administration d'isoniazide pendant six à neuf mois.

Le classement d'antimycobactériens comme médicaments de « deuxième ligne » (cf. tableau S2) répond généralement à deux raisons : ils sont moins efficaces que ceux de première ligne ou ils entraînent des effets secondaires toxiques. Une troisième raison peut être leur indisponibilité dans des pays en cours de développement.


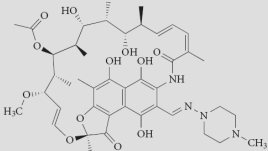
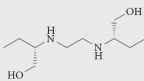

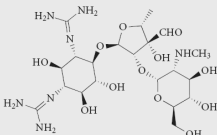
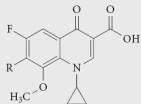


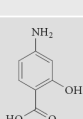
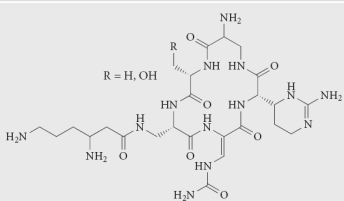
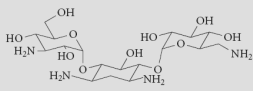
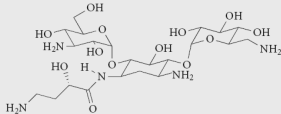
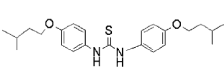
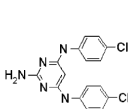
La tuberculose résistante à de multiples drogues (ou MDR-TB) est définie comme l'infection avec une souche de *M. tuberculosis* résistante à l'isoniazide et la rifampicine, les deux antibiotiques de première ligne les plus utilisés. La prescription d'antimycobactériens de deuxième ligne pour traiter ces cas a été confrontée à l'apparition de souches également résistantes aux médicaments de deuxième ligne. Un nouveau terme a vu le jour : XDR-TB pour *extensive drug resistant tuberculosis*, qui, selon le rapport 2006 de l'OMS, désigne une souche de *M. tuberculosis* résistante non seulement à l'isoniazide et la rifampicine (MDR-TB), mais également à au moins trois sur les six classes d'antimycobactériens de deuxième ligne (aminoglycosides, polypeptides, fluoroquinolones, thioamides, cyclosérine et l'acide para-aminosalicylique ; cf. tableau S2).

Selon le rapport de l'OMS « 2008 Tuberculosis facts »<sup>25</sup>, MDR-TB est à l'origine de 5% du total des cas de TB. Environ 490.000 nouveaux cas de MDR-TB sont identifiés tous les ans, dont plus d'un quart sont mortels. 40.000 nouveaux cas de XDR-TB sont diagnostiqués annuellement, la mortalité pouvant atteindre 100% en fonction des régions. En mars 2008, plus de 45 pays hébergeaient des cas de XDR-TB ; les taux les plus importants ayant été notifiés dans l'ex Union Soviétique.

---

<sup>25</sup> [http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet\\_april08.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet_april08.pdf)

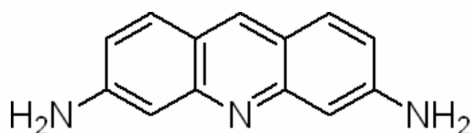
**Tableau S2 : Antibiotiques utilisés dans le traitement de la tuberculose.**Modifié à partir de Sacchetti *et al.* (2008) et Waddell *et al.* (2004)

	Antibiotic	Chemical structure	Mechanism and target
Antibiotiques de première ligne	Isoniazid		Inhibits mycolic acid synthesis; primary target is InhA and secondary targets are KasA and DfrA
	Rifampicin		Inhibits transcription; RNA polymerase $\beta$ -subunit
	Ethambutol		Inhibits arabinogalactan synthesis; possibly EmbB
	Pyrazinamide		Unknown (possibly inhibits FAS-I or alters membrane energetics)
Antibiotiques de deuxième ligne	Streptomycin		Inhibits protein synthesis; 30S ribosomal subunit
	Fluoroquinolones		Inhibits DNA gyrase
	Ethionamide		Inhibits mycolic acid synthesis; InhA <b>classe : thioamides</b>
	Cycloserine		Inhibits peptidoglycan synthesis by blocking the synthesis and use of D-alanine (Ala); Ala racemase and D-Ala-D-Ala ligase
	Para-aminosalicylic acid		Inhibits folate metabolism; possibly dihydropteroate synthase
	Capreomycin		Inhibits protein synthesis; methylated nucleotides in both ribosomal subunits <b>classe : polypeptides</b>
	Kanamycin		Inhibits protein synthesis <b>classe : aminoglycosides</b>
	Amikacin		Inhibits protein synthesis <b>classe : aminoglycosides</b>
Antibiotiques non classés	Isoxyl		Inhibits mycolic acid and shorter-chain fatty acid synthesis
	SRI#967		To be determined

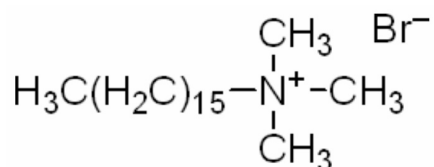


## ANNEXE C : ANTISEPTIQUES ET CATIONS QUATERNAIRES

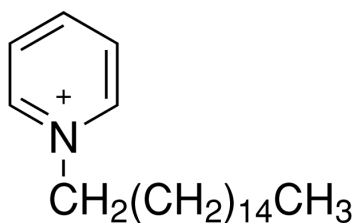
Un antiseptique est une substance qui tue ou prévient la croissance de bactéries et des virus sur les surfaces externes du corps. Les antibiotiques agissent de la même façon, mais à l'intérieur du corps et seulement contre les bactéries.



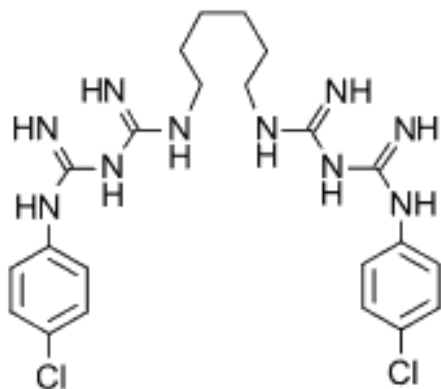
**Acriflavine**



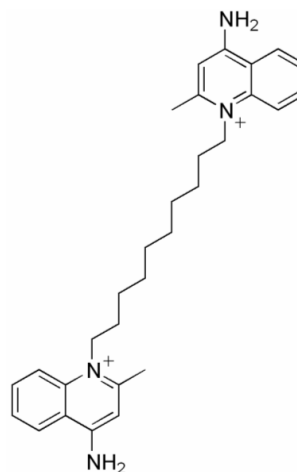
**Cetyl trimethylammonium bromide ou  
Bromure d'hexadécyltriméthylammonium  
(CTAB)**



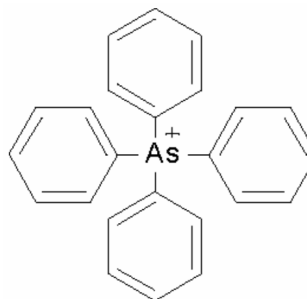
**Cétylpyridinium**



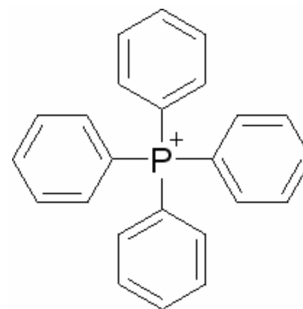
**Chlorhexidine**



**Déqualinium**

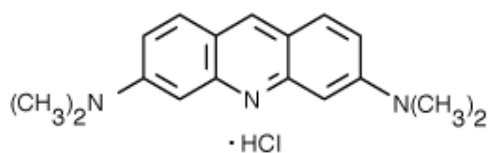


**Tétraphénylarsonium (TPA)**

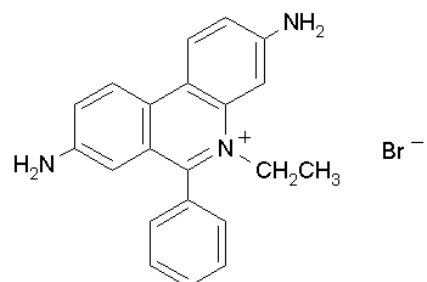


**Tétraphénylphosphonium (TPP)**

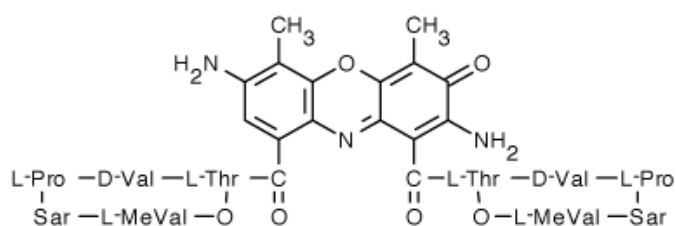
## ANNEXE D : COLORANTS FLUORESCENTS



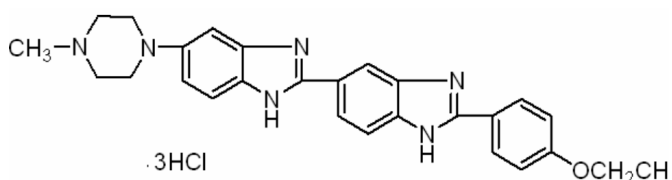
**Orange d'acridine**



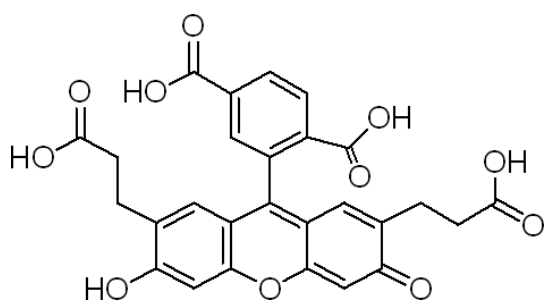
**Bromure d'éthidium**



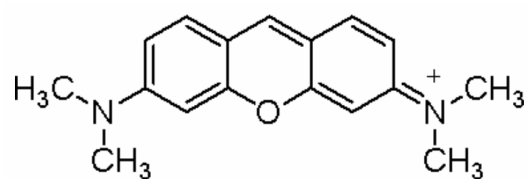
**7-Amino-Actinomycine D (7AAD)**



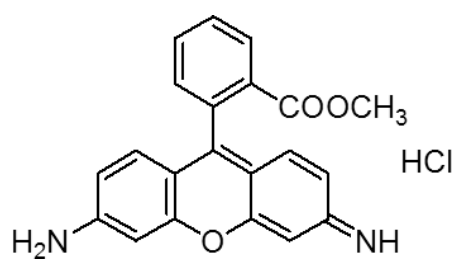
**Hoechst 33342**



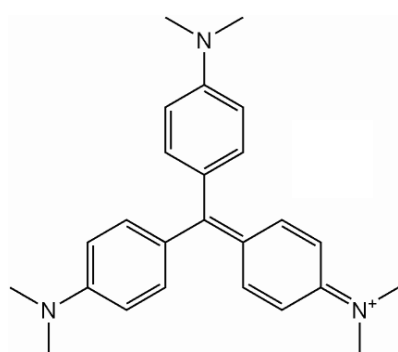
**2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(et-6)-carboxyfluorescéine (BCECF)**



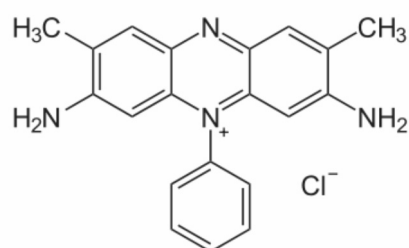
**Pyronine Y**



**Rhodamine-6-G**



**Cristal violet**



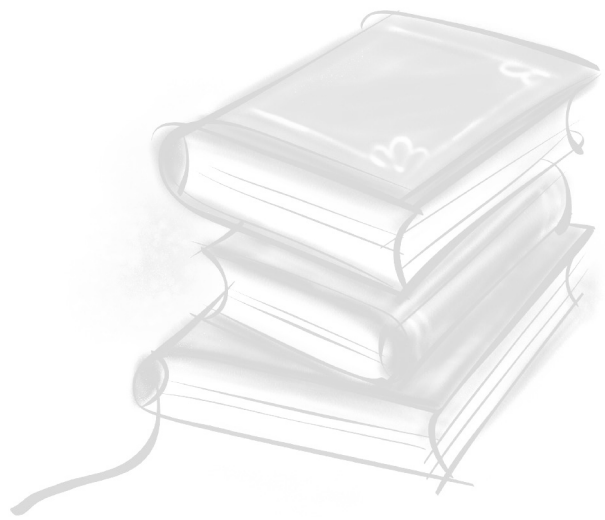
**Safranin**

## STRUCTURES CHIMIQUES DETAILLEES DANS LES ANNEXES A-D

2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(et-6)- carboxyfluorescéine (BCECF).....	196	Gatifloxacin.....	189
7-Amino-Actinomycine D (7AAD).....	196	Hoechst 33342 .....	196
Acide nalidixique.....	189	Isoniazide.....	194
Acide <i>para</i> -aminosalicylique (PAS) .....	194	Isoxyl.....	194
Acriflavine .....	195	Kanamycin.....	194
Amikacin.....	194	Lincomycin.....	191
Amoxicilline.....	188	Linézolide .....	191
Ampicilline.....	188	Mitoxantrone.....	189
Arbécacin.....	190	Néomycin.....	190
Azithromycin.....	191	Norfloxacine.....	189
Berbérine .....	192	Novobiocine.....	189
Bléomycine .....	188	Orange d'acridine .....	196
Bromure d'éthidium .....	196	Pénicilline G.....	188
Bromure d'hexadécyl- triméthylammonium (CTAB).....	195	Pentamidine.....	192
Capréomycine .....	194	Pristinamycine IA.....	191
Céfotaxime.....	188	Pristinamycine IIA.....	191
Cetyl triméthylammonium bromide (CTAB).....	195	Puromycin.....	190
Cétylpyridinium .....	195	Pyrazinamide.....	194
Chloramphénicol.....	190	Pyronine Y .....	196
Chlorhexidine.....	195	Quinupristine .....	191
Ciprofloxacine.....	189	Rhodamine-6-G .....	196
Clarithromycin.....	191	Rifampicine.....	194
Clindamycine .....	191	Safranine .....	196
Cristal violet.....	196	Spectinomycin.....	190
Cyclosérine .....	194	SRI#967.....	194
Dalfoprastine.....	191	Streptogramine A.....	191
Daunorubicine .....	189	Streptogramine B.....	191
Déqualinium.....	195	Streptomycin.....	190, 194
Doxocycline .....	192	Tétracycline .....	192
Doxorubicine.....	189	Tétraphénylarsonium (TPA) .....	195
Erythromycin.....	191	Tétraphénylphosphonium (TPP) .....	195
Ethambutol.....	194	Vancomycin.....	188
Ethionamide.....	194	Virginiamycin M1 .....	191
		Virginiamycin S.....	191



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES





- Aakra, A., H. Vebo, L. Snipen, H. Hirt, A. Aastveit, V. Kapur, G. Dunny, B. E. Murray et I. F. Nes (2005). "Transcriptional response of *Enterococcus faecalis* V583 to erythromycin." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2246-59.
- Abdallah, A. M., N. C. Gey van Pittius, P. A. Champion, J. Cox, J. Luirink, C. M. Vandenbroucke-Grauls, B. J. Appelmek et W. Bitter (2007). "Type VII secretion--mycobacteria show the way." Nat Rev Microbiol **5**(11): 883-91.
- Achard-Joris, M., H. B. vandenBergvanSaparoëa, A. J. M. Driessen et J. P. Bourdineaud (2005). "Heterologously Expressed Bacterial and Human Multidrug Resistance Proteins Confer Cadmium Resistance to *Escherichia coli*." Biochemistry **44**(15): 5916-5922.
- Agustiandari, H., J. Lubelski, H. B. van den Berg van Saparoëa, O. P. Kuipers et A. J. M. Driessen (2008). "LmrR Is a Transcriptional Repressor of Expression of the Multidrug ABC Transporter LmrCD in *Lactococcus lactis*." J. Bacteriol. **190**(2): 759-763.
- Ahmed, M., C. M. Borsch, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop et A. A. Neyfakh (1994). "A protein that activates expression of a multidrug efflux transporter upon binding the transporter substrates." J Biol Chem **269**(45): 28506-13.
- Ahmed, M., L. Lyass, P. N. Markham, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop et A. A. Neyfakh (1995). "Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated." J Bacteriol **177**(14): 3904-10.
- Ainsa, J. A., M. C. Blokpoel, I. Otal, D. B. Young, K. A. De Smet et C. Martin (1998). "Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*." J Bacteriol **180**(22): 5836-43.
- Aires, J. R., T. Kohler, H. Nikaido et P. Plesiat (1999). "Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2624-8.
- Alahari, A., N. Saint, S. Campagna, V. Molle, G. Molle et L. Kremer (2007). "The N-Terminal Domain of OmpATb Is Required for Membrane Translocation and Pore-Forming Activity in Mycobacteria." J. Bacteriol. **189**(17): 6351-6358.
- Aleksandrov, A. A., L. A. Aleksandrov et J. R. Riordan (2007). "CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel." Pflugers Arch **453**(5): 693-702.
- Allignet, J., V. Loncle et N. el Sohl (1992). "Sequence of a staphylococcal plasmid gene, vga, encoding a putative ATP-binding protein involved in resistance to virginiamycin A-like antibiotics." Gene **117**(1): 45-51.
- Allignet, J. et N. El Solh (1997). "Characterization of a new staphylococcal gene, vgaB, encoding a putative ABC transporter conferring resistance to streptogramin A and related compounds." Gene **202**(1-2): 133-8.
- Allikmets, R., L. M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica et M. Dean (1998). "A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance." Cancer Res **58**(23): 5337-9.
- Al-Shawi, M. K., M. K. Polar, H. Omote et R. A. Figler (2003). "Transition state analysis of the coupling of drug transport to ATP hydrolysis by P-glycoprotein." J Biol Chem **278**(52): 52629-40.
- Amano, T., K. Tozawa, M. Yoshida et H. Murakami (1994). "Spatial precision of a catalytic carboxylate of F1-ATPase beta subunit probed by introducing different carboxylate-containing side chains." FEBS Lett **348**(1): 93-8.

- Ambudkar, S. V., I. H. Lelong, J. Zhang, C. O. Cardarelli, M. M. Gottesman et I. Pastan (1992). "Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8472-8476.
- Ames, G. F., C. S. Mimura et V. Shyamala (1990). "Bacterial periplasmic permeases belong to a family of transport proteins operating from *Escherichia coli* to human: Traffic ATPases." FEMS Microbiol Rev **6**(4): 429-46.
- Amrein, K. E., B. Takacs, M. Stieger, J. Molnos, N. A. Flint et P. Burn (1995). "Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1048-52.
- Amsterdam, D. (1996). Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Antibiotics in laboratory medicine. V. Lorian. Baltimore, Williams & Wilkins: pp. 52-111.
- Anderson, I., A. Sorokin, V. Kapatral, G. Reznik, A. Bhattacharya, N. Mikhailova, H. Burd, V. Joukov, D. Kaznadzey, T. Walunas, Markd'Souza, N. Larsen, G. Pusch, K. Liolios, Y. Grechkin, A. Lapidus, E. Goltsman, L. Chu, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek, N. Kyrpides et N. Ivanova (2005). "Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Lett **250**(2): 175-84.
- Ariaratnam, V. et G. P. Georghiou (1974). "Carbamate resistance in *Anopheles albimanus*. Cross resistance spectrum and stability of resistance." Bull World Health Organ **51**(6): 655-9.
- Arsene, F., T. Tomoyasu et B. Bukau (2000). "The heat shock response of *Escherichia coli*." Int J Food Microbiol **55**(1-3): 3-9.
- Artsimovitch, I., V. Patlan, S. Sekine, M. N. Vassilyeva, T. Hosaka, K. Ochi, S. Yokoyama et D. G. Vassilyev (2004). "Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp." Cell **117**(3): 299-310.
- Av-Gay, Y. et M. Everett (2000). "The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*." Trends Microbiol **8**(5): 238-44.
- Azzaria, M., E. Schurr et P. Gros (1989). "Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance." Mol. Cell. Biol. **9**(12): 5289-5297.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner et H. Mori (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." Mol Syst Biol **2**: 2006 0008.
- Balzi, E. et A. Goffeau (1991). "Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast." Biochim Biophys Acta **1073**(2): 241-52.
- Banerjee, S. K., K. Bhatt, P. Misra et P. K. Chakraborti (2000). "Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*." Mol Gen Genet **262**(6): 949-56.
- Barber, M., A. Csillag et A. J. Medway (1958). "Staphylococcal infection resistant to chloramphenicol, erythromycin, and novobiocin; effect of antibiotic combinations on the emergence of resistant strains." Br Med J **2**(5109): 1377-80.
- Basso, C., P. Vergani, A. C. Nairn et D. C. Gadsby (2003). "Prolonged nonhydrolytic interaction of nucleotide with CFTR's NH2-terminal nucleotide binding domain and its role in channel gating." J Gen Physiol **122**(3): 333-48.



- Beck, W. T., M. C. Cirtain, C. J. Glover, R. L. Felsted et A. R. Safa (1988). "Effects of indole alkaloids on multidrug resistance and labeling of P-glycoprotein by a photoaffinity analog of vinblastine." Biochem Biophys Res Commun **153**(3): 959-66.
- Benabdelhak, H., L. Schmitt, C. Horn, K. Jumel, M. A. Blight et I. B. Holland (2005). "Positive co-operative activity and dimerization of the isolated ABC ATPase domain of HlyB from *Escherichia coli*." Biochem J **386**(Pt 3): 489-95.
- Bennett, H. J., D. M. Pearce, S. Glenn, C. M. Taylor, M. Kuhn, A. L. Sonenshein, P. W. Andrew et I. S. Roberts (2007). "Characterization of relA and codY mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence." Mol Microbiol **63**(5): 1453-67.
- Bensadoun, A. et D. Weinstein (1976). "Assay of proteins in the presence of interfering materials." Analytical Biochemistry **70**(1): 241-250.
- Bernard, R., P. Joseph, A. Guiseppi, M. Chippaux et F. Denizot (2003). "YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Lett **228**(1): 93-7.
- Berndt, C., C. H. Lillig et A. Holmgren (2008). "Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding." Biochim Biophys Acta **1783**(4): 641-50.
- Biedler, J. L. et H. Riehm (1970). "Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies." Cancer Res **30**(4): 1174-84.
- Biemans-Oldehinkel, E., M. K. Doeve et B. Poolman (2006a). "ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains." FEBS Lett **580**(4): 1023-35.
- Biemans-Oldehinkel, E., N. A. Mahmood et B. Poolman (2006b). "A sensor for intracellular ionic strength." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10624-9.
- Bifani, P., S. Moghazeh, B. Shopsis, J. Driscoll, A. Ravikovitch et B. N. Kreiswirth (2000). "Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants: distinguishing the mycobacterial laboratory strain." J Clin Microbiol **38**(9): 3200-4.
- Birnboim, H. C. et J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-23.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau et Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." Science **277**(5331): 1453-74.
- Bloom, B. R. et C. J. Murray (1992). "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer." Science **257**(5073): 1055-64.
- Boitel, B., M. Ortiz-Lombardia, R. Duran, F. Pompeo, S. T. Cole, C. Cervenansky et P. M. Alzari (2003). "PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and dephosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Microbiol **49**(6): 1493-508.
- Borths, E. L., B. Poolman, R. N. Hvorup, K. P. Locher et D. C. Rees (2005). "In vitro functional characterization of BtuCD-F, the *Escherichia coli* ABC transporter for vitamin B12 uptake." Biochemistry **44**(49): 16301-9.
- Bouige, P., D. Laurent, L. Piloyan et E. Dassa (2002). "Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems." Curr Protein Pept Sci **3**(5): 541-59.

- Bourdineaud, J. P., B. Nehmé, S. Tesse et A. Lonvaud-Funel (2004). "A bacterial gene homologous to ABC transporters protect *Oenococcus oeni* from ethanol and other stress factors in wine." Int J Food Microbiol **92**(1): 1-14.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Braeken, K., M. Moris, R. Daniels, J. Vanderleyden et J. Michiels (2006). "New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology." Trends Microbiol **14**(1): 45-54.
- Braibant, M., P. Gilot et J. Content (2000). "The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*." FEMS Microbiol Rev **24**(4): 449-67.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick et R. Kolter (2001). "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11621-6.
- Brautigan, D. L., C. L. Shriner et D. C. a. R. A. J. Jackie (1988). Methods to distinguish various types of protein phosphatase activity. Methods in Enzymology, Academic Press. **159**: 339-346.
- Brown, M. H., I. T. Paulsen et R. A. Skurray (1999). "The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters." Mol Microbiol **31**(1): 394-5.
- Buroni, S., G. Manina, P. Guglielame, M. R. Pasca, G. Riccardi et E. De Rossi (2006). "LfrR is a repressor that regulates expression of the efflux pump LfrA in *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **50**(12): 4044-52.
- Cao, M., P. A. Kobel, M. M. Morshedi, M. F. Wu, C. Paddon et J. D. Helmann (2002a). "Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches." J Mol Biol **316**(3): 443-57.
- Cao, M., T. Wang, R. Ye et J. D. Helmann (2002b). "Antibiotics that inhibit cell wall biosynthesis induce expression of the *Bacillus subtilis* sigma(W) and sigma(M) regulons." Mol Microbiol **45**(5): 1267-76.
- Carlsen, S. A., J. E. Till et V. Ling (1976). "Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells." Biochim Biophys Acta **455**(3): 900-12.
- Carson, M. R., S. M. Travis et M. J. Welsh (1995). "The Two Nucleotide-binding Domains of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) Have Distinct Functions in Controlling Channel Activity." J. Biol. Chem. **270**(4): 1711-1717.
- Cashel, M. et J. Gallant (1969). "Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*." Nature **221**(5183): 838-41.
- Chai, T. J. et J. Foulds (1977). "*Escherichia coli* K-12 tolF mutants: alterations in protein composition of the outer membrane." J. Bacteriol. **130**(2): 781-786.
- Chami, M., G. Pehau-Arnaudet, O. Lambert, J. L. Ranck, D. Levy et J. L. Rigaud (2001). "Use of octyl beta-thioglucopyranoside in two-dimensional crystallization of membrane proteins." J Struct Biol **133**(1): 64-74.
- Chang, X.-B., Y.-X. Hou et J. R. Riordan (1997). "ATPase Activity of Purified Multidrug Resistance-associated Protein." J. Biol. Chem. **272**(49): 30962-30968.
- Chang, G., C. B. Roth, C. L. Reyes, O. Pornillos, Y. J. Chen et A. P. Chen (2006). "Retraction." Science **314**(5807): 1875.

- Chen, C. J., J. E. Chin, K. Ueda, D. P. Clark, I. Pastan, M. M. Gottesman et I. B. Roninson (1986). "Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells." Cell **47**(3): 381-9.
- Chen, Y. N., L. A. Mickley, A. M. Schwartz, E. M. Acton, J. L. Hwang et A. T. Fojo (1990). "Characterization of adriamycin-resistant human breast cancer cells which display overexpression of a novel resistance-related membrane protein." J Biol Chem **265**(17): 10073-80.
- Chen, J., Y. Morita, M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima et T. Tsuchiya (2002). "VmrA, a member of a novel class of Na(+)-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*." J Bacteriol **184**(2): 572-6.
- Chen, J., G. Lu, J. Lin, A. L. Davidson et F. A. Quiocho (2003a). "A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle." Mol Cell **12**(3): 651-61.
- Chen, Y., J. Song, S.-f. Sui et D.-N. Wang (2003b). "DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*." Prot Expr Purif **32**(2): 221-231.
- Chen, Y. J., O. Pornillos, S. Lieu, C. Ma, A. P. Chen et G. Chang (2007). "X-ray structure of EmrE supports dual topology model." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 18999-9004.
- Cheng, J., A. A. Guffanti et T. A. Krulwich (1994). "The chromosomal tetracycline resistance locus of *Bacillus subtilis* encodes a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter that is physiologically important at elevated pH." J Biol Chem **269**(44): 27365-71.
- Chesneau, O., H. Ligeret, N. Hosan-Aghaie, A. Morvan et E. Dassa (2005). "Molecular Analysis of Resistance to Streptogramin A Compounds Conferred by the Vga Proteins of Staphylococci." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(3): 973-980.
- Choudhuri, B. S., S. Bhakta, R. Barik, J. Basu, M. Kundu et P. Chakrabarti (2002). "Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drdA* and *drdB* of *Mycobacterium tuberculosis*." Biochem. J. **367**(1): 279-285.
- Chu, D. T., J. J. Plattner et L. Katz (1996). "New directions in antibacterial research." J Med Chem **39**(20): 3853-74.
- Cole, S. P., G. Bhardwaj, J. H. Gerlach, J. E. Mackie, C. E. Grant, K. C. Almquist, A. J. Stewart, E. U. Kurz, A. M. Duncan et R. G. Deeley (1992). "Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line." Science **258**(5088): 1650-4.
- Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead et B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-44.
- Cole, S. P. et R. G. Deeley (2006). "Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1." Trends Pharmacol Sci **27**(8): 438-46.
- Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon et G. Deleage (2000). "NPS@: network protein sequence analysis." Trends Biochem Sci **25**(3): 147-50.
- Cosa, G., K. S. Focsaneanu, J. R. McLean, J. P. McNamee et J. C. Scaiano (2001). "Photophysical properties of fluorescent DNA-dyes bound to single- and double-stranded DNA in aqueous buffered solution." Photochem Photobiol **73**(6): 585-99.

- Cox, J. S., B. Chen, M. McNeil et W. R. Jacobs, Jr. (1999). "Complex lipid determines tissue-specific replication of *Mycobacterium tuberculosis* in mice." *Nature* **402**(6757): 79-83.
- Cruz-Ramos, H., G. M. Cook, G. Wu, M. W. Cleeter et R. K. Poole (2004). "Membrane topology and mutational analysis of *Escherichia coli* CydDC, an ABC-type cysteine exporter required for cytochrome assembly." *Microbiology* **150**(Pt 10): 3415-27.
- Curry, J. M., R. Whalan, D. M. Hunt, K. Gohil, M. Strom, L. Rickman, M. J. Colston, S. J. Smerdon et R. S. Buxton (2005). "An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice." *Infect Immun* **73**(8): 4471-7.
- Cuthbertson, L., M. S. Kimber et C. Whitfield (2007). "Substrate binding by a bacterial ABC transporter involved in polysaccharide export." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(49): 19529-34.
- Dahan, D., A. Evagelidis, J. W. Hanrahan, D. A. Hinkson, Y. Jia, J. Luo et T. Zhu (2001). "Regulation of the CFTR channel by phosphorylation." *Pflügers Arch* **443 Suppl 1**: S92-6.
- Dalmas, O., M. A. Do Cao, M. R. Lugo, F. J. Sharom, A. Di Pietro et J. M. Jault (2005a). "Time-resolved fluorescence resonance energy transfer shows that the bacterial multidrug ABC half-transporter BmrA functions as a homodimer." *Biochemistry* **44**(11): 4312-21.
- Dalmas, O., C. Orelle, A. E. Foucher, C. Geourjon, S. Crouzy, A. Di Pietro et J. M. Jault (2005b). "The Q-loop disengages from the first intracellular loop during the catalytic cycle of the multidrug ABC transporter BmrA." *J Biol Chem* **280**(44): 36857-64.
- Dandekar, T., B. Snel, M. Huynen et P. Bork (1998). "Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact." *Trends Biochem Sci* **23**(9): 324-8.
- Danilchanka, O., C. Mailaender et M. Niederweis (2008). "Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(7): 2503-11.
- Dassa, E. et M. Hofnung (1985). "Sequence of gene malG in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems." *Embo J* **4**(9): 2287-93.
- Dassa, E., M. Hofnung, I. T. Paulsen et M. H. Saier, Jr. (1999). "The *Escherichia coli* ABC transporters: an update." *Molecular Microbiology* **32**(4): 887-889.
- Davidson, A. L., H. A. Shuman et H. Nikaido (1992). "Mechanism of maltose transport in *Escherichia coli*: transmembrane signaling by periplasmic binding proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2360-4.
- Davidson, A. L. et S. Sharma (1997). "Mutation of a single MalK subunit severely impairs maltose transport activity in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **179**(17): 5458-5464.
- Davidson, A. L., S. S. Laghaeian et D. E. Mannering (1996). "The Maltose Transport System of *Escherichia coli* Displays Positive Cooperativity in ATP Hydrolysis." *J. Biol. Chem.* **271**(9): 4858-4863.
- Davidson, A. L. et J. Chen (2004). "ATP-binding cassette transporters in bacteria." *Annu Rev Biochem* **73**: 241-68.
- Davidson, A. L. et P. C. Maloney (2007). "ABC transporters: how small machines do a big job." *Trends Microbiol* **15**(10): 448-55.
- Davidson, A. L., E. Dassa, C. Orelle et J. Chen (2008). "Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems." *Microbiol Mol Biol Rev* **72**(2): 317-64.

- Davies, J., G. B. Spiegelman et G. Yim (2006). "The world of subinhibitory antibiotic concentrations." Curr Opin Microbiol **9**(5): 445-53.
- Davis, D. R., J. B. McAlpine, C. J. Pazoles, M. K. Talbot, E. A. Alder, C. White, B. M. Jonas, B. E. Murray, G. M. Weinstock et B. L. Rogers (2001). "*Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery." J Mol Microbiol Biotechnol **3**(2): 179-84.
- Dawson, R. J. et K. P. Locher (2006). "Structure of a bacterial multidrug ABC transporter." Nature **443**(7108): 180-5.
- Dawson, R. J., K. Hollenstein et K. P. Locher (2007a). "Uptake or extrusion: crystal structures of full ABC transporters suggest a common mechanism." Mol Microbiol **65**(2): 250-7.
- Dawson, R. J. et K. P. Locher (2007b). "Structure of the multidrug ABC transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus* in complex with AMP-PNP." FEBS Lett **581**(5): 935-8.
- de Marco, A., E. Deuerling, A. Mogk, T. Tomoyasu et B. Bukau (2007). "Chaperone-based procedure to increase yields of soluble recombinant proteins produced in *E. coli*." BMC Biotechnol **7**: 32.
- De Rossi, E., M. C. Blokpoel, R. Cantoni, M. Branzoni, G. Riccardi, D. B. Young, K. A. De Smet et O. Ciferri (1998). "Molecular cloning and functional analysis of a novel tetracycline resistance determinant, tet(V), from *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **42**(8): 1931-7.
- De Rossi, E., P. Arrigo, M. Bellinzoni, P. A. Silva, C. Martin, J. A. Ainsa, P. Guglierame et G. Riccardi (2002). "The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*." Mol Med **8**(11): 714-24.
- De Rossi, E., J. A. Ainsa et G. Riccardi (2006). "Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question." FEMS Microbiol Rev **30**(1): 36-52.
- Dean, M., A. Rzhetsky et R. Allikmets (2001). "The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily." Genome Res **11**(7): 1156-66.
- Deaton, J., J. Sun, A. Holzenburg, D. K. Struck, J. Berry et R. Young (2004). "Functional bacteriorhodopsin is efficiently solubilized and delivered to membranes by the chaperonin GroEL." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2281-6.
- Decottignies, A., M. Kolaczowski, E. Balzi et A. Goffeau (1994). "Solubilization and characterization of the overexpressed PDR5 multidrug resistance nucleotide triphosphatase of yeast." J. Biol. Chem. **269**(17): 12797-12803.
- Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 149-61.
- den Kamp, J. A., I. Redai et L. L. van Deenen (1969). "Phospholipid composition of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **99**(1): 298-303.
- Deol, P., R. Vohra, A. K. Saini, A. Singh, H. Chandra, P. Chopra, T. K. Das, A. K. Tyagi et Y. Singh (2005). "Role of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr kinase PknF: implications in glucose transport and cell division." J Bacteriol **187**(10): 3415-20.
- Doerrler, W. T. et C. R. Raetz (2002). "ATPase activity of the MsbA lipid flippase of *Escherichia coli*." J Biol Chem **277**(39): 36697-705.
- Doerrler, W. T., H. S. Gibbons et C. R. Raetz (2004). "MsbA-dependent translocation of lipids across the inner membrane of *Escherichia coli*." J Biol Chem **279**(43): 45102-9.
- Dong, J., G. Yang et H. S. McHaourab (2005). "Structural basis of energy transduction in the transport cycle of MsbA." Science **308**(5724): 1023-8.

- Duran, R., A. Villarino, M. Bellinzoni, A. Wehenkel, P. Fernandez, B. Boitel, S. T. Cole, P. M. Alzari et C. Cervenansky (2005). "Conserved autophosphorylation pattern in activation loops and juxtamembrane regions of *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinases." Biochem Biophys Res Commun **333**(3): 858-67.
- Durocher, D., I. A. Taylor, D. Sarbassova, L. F. Haire, S. L. Westcott, S. P. Jackson, S. J. Smerdon et M. B. Yaffe (2000). "The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms." Mol Cell **6**(5): 1169-82.
- Durocher, D. et S. P. Jackson (2002). "The FHA domain." FEBS Lett **513**(1): 58-66.
- Earl, A. M., R. Losick et R. Kolter (2008). "Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*." Trends Microbiol **16**(6): 269-75.
- Eckford, P. D. et F. J. Sharom (2008). "Functional characterization of *Escherichia coli* MsbA: interaction with nucleotides and substrates." J Biol Chem **283**(19): 12840-50.
- Eichenberger, P., M. Fujita, S. T. Jensen, E. M. Conlon, D. Z. Rudner, S. T. Wang, C. Ferguson, K. Haga, T. Sato, J. S. Liu et R. Losick (2004). "The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*." PLoS Biol **2**(10): e328.
- Ellermeier, C. D., E. C. Hobbs, J. E. Gonzalez-Pastor et R. Losick (2006). "A three-protein signaling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin." Cell **124**(3): 549-59.
- Ernst, R., J. Koch, C. Horn, R. Tampe et L. Schmitt (2006). "Engineering ATPase activity in the isolated ABC cassette of human TAP1." J Biol Chem **281**(37): 27471-80.
- Ernst, R., P. Kueppers, C. M. Klein, T. Schwarzmüller, K. Kuchler et L. Schmitt (2008). "A mutation of the H-loop selectively affects rhodamine transport by the yeast multidrug ABC transporter Pdr5." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5069-74.
- Errington, J. (2003). "Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*." Nat Rev Microbiol **1**(2): 117-26.
- Eymann, C., G. Homuth, C. Scharf et M. Hecker (2002). "*Bacillus subtilis* functional genomics: global characterization of the stringent response by proteome and transcriptome analysis." J Bacteriol **184**(9): 2500-20.
- Eytan, G. D., R. Regev et Y. G. Assaraf (1996). "Functional reconstitution of P-glycoprotein reveals an apparent near stoichiometric drug transport to ATP hydrolysis." J Biol Chem **271**(6): 3172-8.
- Fabret, C., V. A. Feher et J. A. Hoch (1999). "Two-component signal transduction in *Bacillus subtilis*: how one organism sees its world." J Bacteriol **181**(7): 1975-83.
- Fernandez-Moreno, M. A., L. Carbo, T. Cuesta, C. Vallin et F. Malpartida (1998). "A Silent ABC Transporter Isolated from *Streptomyces rochei* F20 Induces Multidrug Resistance." J. Bacteriol. **180**(16): 4017-4023.
- Ferreira-Pereira, A., S. Marco, A. Decottignies, J. Nader, A. Goffeau et J.-L. Rigaud (2003). "Three-dimensional Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Multidrug Resistance Protein Pdr5p." J. Biol. Chem. **278**(14): 11995-11999.
- Fischer, H. P. et C. Freiberg (2007). "Applications of transcriptional profiling in antibiotics discovery and development." Prog Drug Res **64**: 21, 23-47.
- Freiberg, C., N. Brunner, L. Macko et H. P. Fischer (2006). "Discovering antibiotic efficacy biomarkers: toward mechanism-specific high content compound screening." Mol Cell Proteomics **5**(12): 2326-35.

- Fu, L. M. et C. S. Fu-Liu (2002). "Is *Mycobacterium tuberculosis* a closer relative to Gram-positive or Gram-negative bacterial pathogens?" Tuberculosis (Edinb) **82**(2-3): 85-90.
- Fujita, M. et R. Losick (2005). "Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A." Genes Dev **19**(18): 2236-44.
- Fukushima, S., M. Yoshimura, T. Chibazakura, T. Sato et H. Yoshikawa (2006). "The putative ABC transporter YheH/YheI is involved in the signalling pathway that activates KinA during sporulation initiation." FEMS Microbiol Lett **256**(1): 90-7.
- Gadsby, D. C., P. Vergani et L. Csanady (2006). "The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis." Nature **440**(7083): 477-83.
- Gao, M., H.-R. Cui, D. W. Loe, C. E. Grant, K. C. Almquist, S. P. C. Cole et R. G. Deeley (2000). "Comparison of the Functional Characteristics of the Nucleotide Binding Domains of Multidrug Resistance Protein 1." J. Biol. Chem. **275**(17): 13098-13108.
- Garrigues, A., A. E. Escargueil et S. p. Orlowski (2002). "The multidrug transporter, P-glycoprotein, actively mediates cholesterol redistribution in the cell membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10347-10352.
- Garvey, M. I. et L. J. V. Piddock (2008). "The Efflux Pump Inhibitor Reserpine Selects Multidrug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Strains That Overexpress the ABC Transporters PatA and PatB." Antimicrob. Agents Chemother. **52**(5): 1677-1685.
- Geertsma, E. R., N. A. Nik Mahmood, G. K. Schuurman-Wolters et B. Poolman (2008). "Membrane reconstitution of ABC transporters and assays of translocator function." Nat Protoc **3**(2): 256-66.
- Georghiou, G. P. (1972). "The Evolution of Resistance to Pesticides." Annu Rev Ecology Systematics **3**(1): 133-168.
- Geourjon, C., C. Orelle, E. Steinfels, C. Blanchet, G. Deleage, A. Di Pietro et J. M. Jault (2001). "A common mechanism for ATP hydrolysis in ABC transporter and helicase superfamilies." Trends Biochem Sci **26**(9): 539-44.
- Gerber, S., M. Comellas-Bigler, B. A. Goetz et K. P. Locher (2008). "Structural basis of trans-inhibition in a molybdate/tungstate ABC transporter." Science **321**(5886): 246-50.
- Gerlach, J. H., J. A. Endicott, P. F. Juranka, G. Henderson, F. Sarangi, K. L. Deuchars et V. Ling (1986). "Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance." Nature **324**(6096): 485-9.
- Germann, U. A., T. C. Chambers, S. V. Ambudkar, I. Pastan et M. M. Gottesman (1995). "Effects of phosphorylation of P-glycoprotein on multidrug resistance." J Bioenerg Biomembr **27**(1): 53-61.
- Ghanei, H., P. D. Abeyrathne et J. S. Lam (2007). "Biochemical Characterization of MsbA from *Pseudomonas aeruginosa*." J. Biol. Chem. **282**(37): 26939-26947.
- Gollnick, P. et P. Babitzke (2002). "Transcription attenuation." Biochim Biophys Acta **1577**(2): 240-50.
- Gonzalez-Pastor, J. E., E. C. Hobbs et R. Losick (2003). "Cannibalism by sporulating bacteria." Science **301**(5632): 510-3.
- Gonzalo Asensio, J., C. Maia, N. L. Ferrer, N. Barilone, F. Laval, C. Y. Soto, N. Winter, M. Daffe, B. Gicquel, C. Martin et M. Jackson (2006). "The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*." J Biol Chem **281**(3): 1313-6.

- Gopalaswamy, R., S. Narayanan, W. R. Jacobs, Jr. et Y. Av-Gay (2008). "*Mycobacterium smegmatis* biofilm formation and sliding motility are affected by the serine/threonine protein kinase PknF." FEMS Microbiol Lett **278**(1): 121-7.
- Greenstein, A. E., C. Grundner, N. Echols, L. M. Gay, T. N. Lombana, C. A. Miecskowski, K. E. Pullen, P. Y. Sung et T. Alber (2005). "Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*." J Mol Microbiol Biotechnol **9**(3-4): 167-81.
- Greenstein, A. E., J. A. MacGurn, C. E. Baer, A. M. Falick, J. S. Cox et T. Alber (2007). "M. tuberculosis Ser/Thr protein kinase D phosphorylates an anti-anti-sigma factor homolog." PLoS Pathog **3**(4): e49.
- Grkovic, S., M. H. Brown et R. A. Skurray (2002). "Regulation of bacterial drug export systems." Microbiol Mol Biol Rev **66**(4): 671-701.
- Grossman, A. D. et R. Losick (1988). "Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(12): 4369-73.
- Grundner, C., L. M. Gay et T. Alber (2005). "*Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknB, PknD, PknE, and PknF phosphorylate multiple FHA domains." Protein Sci **14**(7): 1918-21.
- Guiral, M., O. Viratelle, H. V. Westerhoff et J. Lankelma (1994). "Cooperative P-glycoprotein mediated daunorubicin transport into DNA-loaded plasma membrane vesicles." FEBS Letters **346**(2-3): 141-145.
- Gutierrez, M. C., S. Brisse, R. Brosch, M. Fabre, B. Omais, M. Marmiesse, P. Supply et V. Vincent (2005). "Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*." PLoS Pathog **1**(1): e5.
- Haldenwang, W. G. (1995). "The sigma factors of *Bacillus subtilis*." Microbiol. Rev. **59**(1): 1-30.
- Hanekop, N., J. Zaitseva, S. Jenewein, I. B. Holland et L. Schmitt (2006). "Molecular insights into the mechanism of ATP-hydrolysis by the NBD of the ABC-transporter HlyB." FEBS Lett **580**(4): 1036-41.
- Hannun, Y. A. (1997). "Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy." Blood **89**(6): 1845-53.
- Haroche, J., J. Allignet, C. Buchrieser et N. El Solh (2000). "Characterization of a variant of vga(A) conferring resistance to streptogramin A and related compounds." Antimicrob Agents Chemother **44**(9): 2271-5.
- Harris, B. Z., D. Kaiser et M. Singer (1998). "The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*." Genes Dev **12**(7): 1022-35.
- Haseltine, W. A. et R. Block (1973). "Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(5): 1564-8.
- Hecker, M. et U. Völker (1990). "General stress proteins in *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiology Letters **74**(2-3): 197-213.
- Heitzer, A., C. A. Mason et G. Hamer (1992). "Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*." J Biotechnol **22**(1-2): 153-69.
- Heldwein, E. E. et R. G. Brennan (2001). "Crystal structure of the transcription activator BmrR bound to DNA and a drug." Nature **409**(6818): 378-82.
- Helmann, J. D. (2002). "The extracytoplasmic function (ECF) sigma factors." Adv Microb Physiol **46**: 47-110.



- Higgins, C. F., I. D. Hiles, G. P. Salmond, D. R. Gill, J. A. Downie, I. J. Evans, I. B. Holland, L. Gray, S. D. Buckel, A. W. Bell et al. (1986). "A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria." Nature **323**(6087): 448-50.
- Higgins, C. F., M. P. Gallagher, M. L. Mimmack et S. R. Pearce (1988). "A family of closely related ATP-binding subunits from prokaryotic and eukaryotic cells." Bioessays **8**(4): 111-6.
- Higgins, C. F. (1992). "ABC transporters: from microorganisms to man." Annu Rev Cell Biol **8**: 67-113.
- Higgins, C. F. et K. J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." Nat Struct Mol Biol **11**(10): 918-26.
- Higgins, C. F. (2007). "Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters." Nature **446**(7137): 749-57.
- Hingley-Wilson, S. M., V. K. Sambandamurthy et W. R. Jacobs, Jr. (2003). "Survival perspectives from the world's most successful pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*." Nat Immunol **4**(10): 949-55.
- Hirohashi, T., H. Suzuki, H. Takikawa et Y. Sugiyama (2000). "ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3)." J Biol Chem **275**(4): 2905-10.
- Hofmann, K. et P. Bucher (1995). "The FHA domain: a putative nuclear signalling domain found in protein kinases and transcription factors." Trends Biochem Sci **20**(9): 347-9.
- Hoffmann, C., A. Leis, M. Niederweis, J. M. Plitzko et H. Engelhardt (2008). "Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3963-7.
- Hollenstein, K., R. J. Dawson et K. P. Locher (2007a). "Structure and mechanism of ABC transporter proteins." Curr Opin Struct Biol **17**(4): 412-8.
- Hollenstein, K., D. C. Frei et K. P. Locher (2007b). "Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein." Nature **446**(7132): 213-6.
- Hou, Y.-x., L. Cui, J. R. Riordan et X.-b. Chang (2000). "Allosteric Interactions between the Two Non-equivalent Nucleotide Binding Domains of Multidrug Resistance Protein MRP1." J. Biol. Chem. **275**(27): 20280-20287.
- Hou, Y.-x., L. Cui, J. R. Riordan et X.-b. Chang (2002). "ATP Binding to the First Nucleotide-binding Domain of Multidrug Resistance Protein MRP1 Increases Binding and Hydrolysis of ATP and Trapping of ADP at the Second Domain." J. Biol. Chem. **277**(7): 5110-5119.
- Huda, N., E.-W. Lee, J. Chen, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima et T. Tsuchiya (2003). "Molecular Cloning and Characterization of an ABC Multidrug Efflux Pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(8): 2413-2417.
- Hung, L. W., I. X. Wang, K. Nikaido, P. Q. Liu, G. F. Ames et S. H. Kim (1998). "Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter." Nature **396**(6712): 703-7.
- Hunte, C. et S. Richers (2008). "Lipids and membrane protein structures." Current Opinion in Structural Biology **18**(4): 406-411.
- Hutter, B., C. Fischer, A. Jacobi, C. Schaab et H. Loferer (2004a). "Panel of *Bacillus subtilis* reporter strains indicative of various modes of action." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2588-94.
- Hutter, B., C. Schaab, S. Albrecht, M. Borgmann, N. A. Brunner, C. Freiberg, K. Ziegelbauer, C. O. Rock, I. Ivanov et H. Loferer (2004b). "Prediction of mechanisms of action of antibacterial compounds by gene expression profiling." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 2838-44.

- Huynen, M. A. et P. Bork (1998). "Measuring genome evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 5849-56.
- Hvorup, R. N., B. A. Goetz, M. Niederer, K. Hollenstein, E. Perozo et K. P. Locher (2007). "Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF." Science **317**(5843): 1387-90.
- Ikuma, M. et M. J. Welsh (2000). "Regulation of CFTR Cl<sup>-</sup> channel gating by ATP binding and hydrolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8675-8680.
- Inouye, S., R. Jain, T. Ueki, H. Nariya, C. Y. Xu, M. Y. Hsu, B. A. Fernandez-Luque, J. Munoz-Dorado, E. Farez-Vidal et M. Inouye (2000). "A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium." Microb Comp Genomics **5**(2): 103-20.
- Jack, D. L., M. L. Storms, J. H. Tchieu, I. T. Paulsen et M. H. Saier, Jr. (2000). "A broad-specificity multidrug efflux pump requiring a pair of homologous SMR-type proteins." J Bacteriol **182**(8): 2311-3.
- Jardetzky, O. (1966). "Simple allosteric model for membrane pumps." Nature **211**(5052): 969-70.
- Jiang, X., W. Zhang, Y. Zhang, F. Gao, C. Lu, X. Zhang et H. Wang (2008). "Assessment of efflux pump gene expression in a clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* by real-time reverse transcription PCR." Microb Drug Resist **14**(1): 7-11.
- Jin, L., X. Wei, J. Gomez, M. Datta, A. Birkett et D. L. Peterson (1995). "Use of alpha-N,N-bis[carboxymethyl]lysine-modified peroxidase in immunoassays." Anal Biochem **229**(1): 54-60.
- Johnson, I. S., J. G. Armstrong, M. Gorman et J. P. Burnett, Jr. (1963). "The Vinca Alkaloids: a New Class of Oncolytic Agents." Cancer Res **23**: 1390-427.
- Johnson, Z. I. et S. W. Chisholm (2004). "Properties of overlapping genes are conserved across microbial genomes." Genome Res **14**(11): 2268-72.
- Joly, N., A. Bohm, W. Boos et E. Richet (2004). "MalK, the ATP-binding cassette component of the *Escherichia coli* maltodextrin transporter, inhibits the transcriptional activator malt by antagonizing inducer binding." J Biol Chem **279**(32): 33123-30.
- Joseph, B., K. Przybilla, C. Stuhler, K. Schauer, J. Slaghuis, T. M. Fuchs et W. Goebel (2006). "Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening." J Bacteriol **188**(2): 556-68.
- Juliano, R. L. et V. Ling (1976). "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants." Biochim Biophys Acta **455**(1): 152-62.
- Kadaba, N. S., J. T. Kaiser, E. Johnson, A. Lee et D. C. Rees (2008). "The high-affinity *E. coli* methionine ABC transporter: structure and allosteric regulation." Science **321**(5886): 250-3.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Katzmann, D. J., T. C. Hallstrom, Y. Mahe et W. S. Moye-Rowley (1996). "Multiple Pdr1p/Pdr3p Binding Sites Are Essential for Normal Expression of the ATP Binding Cassette Transporter Protein-encoding Gene PDR5." J. Biol. Chem. **271**(38): 23049-23054.
- Kaur, P. et J. Russell (1998). "Biochemical Coupling between the DrrA and DrrB Proteins of the Doxorubicin Efflux Pump of *Streptomyces peucetius*." J. Biol. Chem. **273**(28): 17933-17939.
- Kay, B. K., M. P. Williamson et M. Sudol (2000). "The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains." Faseb J **14**(2): 231-41.

- Keppler, D., I. Leier et G. Jedlitschky (1997). "Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2." Biol Chem **378**(8): 787-91.
- Kerr, I. D., E. D. Reynolds et J. H. Cove (2005). "ABC proteins and antibiotic drug resistance: is it all about transport?" Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1000-2.
- Kim, S. et S. B. Lee (2006). "Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*." Protein Expr Purif **50**(1): 49-57.
- Klammt, C., D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dotsch et F. Bernhard (2005). "Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system." Febs J **272**(23): 6024-38.
- Klugman, K. P. (2001). "Antibiotic selection of multiply resistant pneumococci." Clin Infect Dis **33**(4): 489-91.
- Kobae, Y., T. Sekino, H. Yoshioka, T. Nakagawa, E. Martinoia et M. Maeshima (2006). "Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection." Plant Cell Physiol **47**(3): 309-18.
- Kobayashi, N., K. Nishino et A. Yamaguchi (2001). "Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*." J. Bacteriol. **183**(19): 5639-5644.
- Korepanova, A., F. P. Gao, Y. Hua, H. Qin, R. K. Nakamoto et T. A. Cross (2005). "Cloning and expression of multiple integral membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*." Protein Sci **14**(1): 148-58.
- Korkhov, V. M. et C. G. Tate (2008). "Electron crystallography reveals plasticity within the drug binding site of the small multidrug transporter EmrE." J Mol Biol **377**(4): 1094-103.
- Krasny, L., H. Tiserova, J. Jonak, D. Rejman et H. Sanderova (2008). "The identity of the transcription +1 position is crucial for changes in gene expression in response to amino acid starvation in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **69**(1): 42-54.
- Krell, T., J. Maclean, D. J. Boam, A. Cooper, M. Resmini, K. Brocklehurst, S. M. Kelly, N. C. Price, A. J. Lapthorn et J. R. Coggins (2001). "Biochemical and X-ray crystallographic studies on shikimate kinase: the important structural role of the P-loop lysine." Protein Sci **10**(6): 1137-49.
- Kumano, M., M. Fujita, K. Nakamura, M. Murata, R. Ohki et K. Yamane (2003). "Lincomycin resistance mutations in two regions immediately downstream of the -10 region of *lmr* promoter cause overexpression of a putative multidrug efflux pump in *Bacillus subtilis* mutants." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 432-5.
- Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin et et al. (1997). "The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*." Nature **390**(6657): 249-56.
- Lakowicz, J. R. (1999). Fluorophores. DNA probes. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, Kluwer Academic/Plenum: p. 76.
- Lambert, O., D. Levy, J. L. Ranck, G. Leblanc et J. L. Rigaud (1998). "A new "gel-like" phase in dodecyl maltoside-lipid mixtures: implications in solubilization and reconstitution studies." Biophys J **74**(2 Pt 1): 918-30.

- Lapinski, P. E., R. R. Neubig et M. Raghavan (2001). "Walker A Lysine Mutations of TAP1 and TAP2 Interfere with Peptide Translocation but Not Peptide Binding." J. Biol. Chem. **276**(10): 7526-7533.
- Laub, M. T. et M. Goulian (2007). "Specificity in two-component signal transduction pathways." Annu Rev Genet **41**: 121-45.
- Laurent, S., J. Jang, A. Janicki, C. C. Zhang et S. Bedu (2008). "Inactivation of spkD, encoding a Ser/Thr kinase, affects the pool of the TCA cycle metabolites in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803." Microbiology **154**(Pt 7): 2161-7.
- Le Maire, M., L. P. Aggerbeck, C. Monteilhet, J. P. Andersen et J. V. Møller (1986). "The use of high-performance liquid chromatography for the determination of size and molecular weight of proteins: A caution and a list of membrane proteins suitable as standards." Anal Biochem **154**(2): 525-535.
- Le Maire, M., J. V. Møller, T. Menguy, J. Velours et P. Champeil (2007). "Protein-protein contacts in solubilized membrane proteins, as detected by cross-linking." Anal Biochem **362**(2): 168-71.
- Lee, E.-W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima et T. Tsuchiya (2003). "EfrAB, an ABC Multidrug Efflux Pump in *Enterococcus faecalis*." Antimicrob. Agents Chemother. **47**(12): 3733-3738.
- Lee, J.-Y., I. L. Urbatsch, A. E. Senior et S. Wilkens (2002). "Projection Structure of P-glycoprotein by Electron Microscopy. Evidence for a closed conformation of the nucleotide binding domains." J. Biol. Chem. **277**(42): 40125-40131.
- Lerner-Marmarosh, N., K. Gimi, I. L. Urbatsch, P. Gros et A. E. Senior (1999). "Large Scale Purification of Detergent-soluble P-glycoprotein from *Pichia pastoris* Cells and Characterization of Nucleotide Binding Properties of Wild-type, Walker A, and Walker B Mutant Proteins." J. Biol. Chem. **274**(49): 34711-34718.
- Lesieur, S., C. Grabielle-Madelmont, M. T. Paternostre et M. Ollivon (1991). "Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity, and dynamic light scattering." Anal Biochem **192**(2): 334-43.
- Leslie, E. M., R. G. Deeley et S. P. Cole (2005). "Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense." Toxicol Appl Pharmacol **204**(3): 216-37.
- Levy, D., A. Bluzat, M. Seigneuret et J. L. Rigaud (1990). "A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal." Biochim Biophys Acta **1025**(2): 179-90.
- Levy, D., A. Gulik, A. Bluzat et J. L. Rigaud (1992). "Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents." Biochim Biophys Acta **1107**(2): 283-98.
- Levy, D., M. Chami et J. L. Rigaud (2001). "Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy." FEBS Lett **504**(3): 187-93.
- Lewinson, O., J. Adler, G. J. Poelarends, P. Mazurkiewicz, A. J. Driessen et E. Bibi (2003). "The *Escherichia coli* multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1667-72.
- Lewinson, O., E. Padan et E. Bibi (2004). "Alkalitolerance: a biological function for a multidrug transporter in pH homeostasis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(39): 14073-8.

- Li, X. Z., D. Ma, D. M. Livermore et H. Nikaido (1994). "Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance." Antimicrob Agents Chemother **38**(8): 1742-52.
- Li, X. Z., L. Zhang et H. Nikaido (2004). "Efflux pump-mediated intrinsic drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2415-23.
- Liao, H., I. J. Byeon et M. D. Tsai (1999). "Structure and function of a new phosphopeptide-binding domain containing the FHA2 of Rad53." J Mol Biol **294**(4): 1041-9.
- Lin, J. T., M. B. Connelly, C. Amolo, S. Otani et D. S. Yaver (2005). "Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics that inhibit protein synthesis." Antimicrob Agents Chemother **49**(5): 1915-26.
- Ling, V. et L. H. Thompson (1974). "Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine." J Cell Physiol **83**(1): 103-16.
- Linton, K. J. et C. F. Higgins (1998). "The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins." Mol Microbiol **28**(1): 5-13.
- Linton, K. J. (2007). "Structure and function of ABC transporters." Physiology (Bethesda) **22**: 122-30.
- Litman, T., T. E. Druley, W. D. Stein et S. E. Bates (2001). "From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance." Cell Mol Life Sci **58**(7): 931-59.
- Liu, C. E., P. Q. Liu et G. F. Ames (1997). "Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC transporter)." J Biol Chem **272**(35): 21883-91.
- Locher, K. P., A. T. Lee et D. C. Rees (2002). "The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism." Science **296**(5570): 1091-8.
- Lomovskaya, O., K. Lewis et A. Matin (1995). "EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB." J Bacteriol **177**(9): 2328-34.
- Loo, T. W., M. C. Bartlett et D. M. Clarke (2004). "The drug-binding pocket of the human multidrug resistance P-glycoprotein is accessible to the aqueous medium." Biochemistry **43**(38): 12081-9.
- Lopez, J. M., A. Dromerick et E. Freese (1981). "Response of guanosine 5'-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation." J Bacteriol **146**(2): 605-13.
- Lopez, C. S., H. Heras, S. M. Ruzal, C. Sanchez-Rivas et E. A. Rivas (1998). "Variations of the envelope composition of *Bacillus subtilis* during growth in hyperosmotic medium." Curr Microbiol **36**(1): 55-61.
- Lowe, S. W., H. E. Ruley, T. Jacks et D. E. Housman (1993). "p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents." Cell **74**(6): 957-67.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr et R. J. Randall (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." J. Biol. Chem. **193**(1): 265-275.
- Lu, P., R. Liu et F. J. Sharom (2001). "Drug transport by reconstituted P-glycoprotein in proteoliposomes. Effect of substrates and modulators, and dependence on bilayer phase state." Eur J Biochem **268**(6): 1687-97.

- Lu, G., J. M. Westbrooks, A. L. Davidson et J. Chen (2005). "ATP hydrolysis is required to reset the ATP-binding cassette dimer into the resting-state conformation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 17969-74.
- Lubelski, J., P. Mazurkiewicz, R. van Merkerk, W. N. Konings et A. J. M. Driessen (2004). "ydaG and ydbA of *Lactococcus lactis* Encode a Heterodimeric ATP-binding Cassette-type Multidrug Transporter." J. Biol. Chem. **279**(33): 34449-34455.
- Lubelski, J., A. de Jong, R. van Merkerk, H. Agustiandari, O. P. Kuipers, J. Kok et A. J. Driessen (2006a). "LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*." Mol Microbiol **61**(3): 771-81.
- Lubelski, J., R. van Merkerk, W. N. Konings et A. J. Driessen (2006b). "Nucleotide-binding sites of the heterodimeric LmrCD ABC-multidrug transporter of *Lactococcus lactis* are asymmetric." Biochemistry **45**(2): 648-56.
- Lubelski, J., W. N. Konings et A. J. Driessen (2007). "Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **71**(3): 463-76.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido et J. E. Hearst (1995). "Genes acrA and acrB encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*." Mol Microbiol **16**(1): 45-55.
- Ma, J., A. Campbell et S. Karlin (2002). "Correlations between Shine-Dalgarno sequences and gene features such as predicted expression levels and operon structures." J Bacteriol **184**(20): 5733-45.
- Marger, M. D. et M. H. Saier, Jr. (1993). "A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport." Trends Biochem Sci **18**(1): 13-20.
- Margolles, A., M. Putman, H. W. van Veen et W. N. Konings (1999). "The purified and functionally reconstituted multidrug transporter LmrA of *Lactococcus lactis* mediates the transbilayer movement of specific fluorescent phospholipids." Biochemistry **38**(49): 16298-306.
- Margolles, A., A. B. Florez, J. A. Moreno, D. van Sinderen et C. G. de los Reyes-Gavilan (2006). "Two membrane proteins from *Bifidobacterium breve* UCC2003 constitute an ABC-type multidrug transporter." Microbiology **152**(12): 3497-3505.
- Marrer, E., K. Schad, A. T. Satoh, M. G. P. Page, M. M. Johnson et L. J. V. Piddock (2006). "Involvement of the Putative ATP-Dependent Efflux Proteins PatA and PatB in Fluoroquinolone Resistance of a Multidrug-Resistant Mutant of *Streptococcus pneumoniae*." Antimicrob. Agents Chemother. **50**(2): 685-693.
- Masaoka, Y., Y. Ueno, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima et T. Tsuchiya (2000). "A two-component multidrug efflux pump, EbrAB, in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **182**(8): 2307-10.
- Maslennikov, I., G. Kefala, C. Johnson, R. Riek, S. Choe et W. Kwiatkowski (2007). "NMR spectroscopic and analytical ultracentrifuge analysis of membrane protein detergent complexes." BMC Struct Biol **7**: 74.
- Matsuo, T., J. Chen, Y. Minato, W. Ogawa, T. Mizushima, T. Kuroda et T. Tsuchiya (2008). "SmdAB, a Heterodimeric ABC-Type Multidrug Efflux Pump, in *Serratia marcescens*." J. Bacteriol. **190**(2): 648-654.
- Mazurkiewicz, P., A. J. Driessen et W. N. Konings (2004). "Energetics of wild-type and mutant multidrug resistance secondary transporter LmrP of *Lactococcus lactis*." Biochim Biophys Acta **1658**(3): 252-61.
- McCormick, A. W., C. G. Whitney, M. M. Farley, R. Lynfield, L. H. Harrison, N. M. Bennett, W. Schaffner, A. Reingold, J. Hadler, P. Cieslak, M. H. Samore et M. Lipsitch (2003).

- "Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States." Nat Med **9**(4): 424-30.
- McDevitt, C. A., R. F. Collins, M. Conway, S. Modok, J. Storm, I. D. Kerr, R. C. Ford et R. Callaghan (2006). "Purification and 3D structural analysis of oligomeric human multidrug transporter ABCG2." Structure **14**(11): 1623-32.
- McHugh, P. J., V. J. Spanswick et J. A. Hartley (2001). "Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance." Lancet Oncol **2**(8): 483-90.
- McMurry, L., R. E. Petrucci, Jr. et S. B. Levy (1980). "Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(7): 3974-7.
- Mendez, C. et J. A. Salas (2001). "The role of ABC transporters in antibiotic-producing organisms: drug secretion and resistance mechanisms." Res Microbiol **152**(3-4): 341-50.
- Mentewab, A. et C. N. Stewart, Jr. (2005). "Overexpression of an Arabidopsis thaliana ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants." Nat Biotechnol **23**(9): 1177-80.
- Merino, E. et C. Yanofsky (2002). Regulation by Termination-Antitermination: a Genomic Approach. Bacillus subtilis and its closest relatives : from genes to cells. A. L. Sonenshein, J. A. Hoch and R. Losick. Washington, D.C., ASM Press: 323-336.
- Miroux, B. et J. E. Walker (1996). "Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels." J Mol Biol **260**(3): 289-98.
- Miyake, K., L. Mickley, T. Litman, Z. Zhan, R. Robey, B. Cristensen, M. Brangi, L. Greenberger, M. Dean, T. Fojo et S. E. Bates (1999). "Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes." Cancer Res **59**(1): 8-13.
- Mizuno, T. (1997). "Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*." DNA Res **4**(2): 161-8.
- Molle, V., L. Kremer, C. Girard-Blanc, G. S. Besra, A. J. Cozzzone et J. F. Prost (2003). "An FHA phosphoprotein recognition domain mediates protein EmbR phosphorylation by PknH, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*." Biochemistry **42**(51): 15300-9.
- Molle, V., D. Soulat, J. M. Jault, C. Grangeasse, A. J. Cozzzone et J. F. Prost (2004). "Two FHA domains on an ABC transporter, Rv1747, mediate its phosphorylation by PknF, a Ser/Thr protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*." FEMS Microbiol Lett **234**(2): 215-23.
- Molle, V., N. Saint, S. Campagna, L. Kremer, E. Lea, P. Draper et G. Molle (2006). "pH-dependent pore-forming activity of OmpATb from *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of the channel by peptidic dissection." Mol Microbiol **61**(3): 826-37.
- Molle, V., R. C. Reynolds, L. J. Alderwick, G. S. Besra, A. J. Cozzzone, K. Futterer et L. Kremer (2008). "EmbR2, a structural homologue of EmbR, inhibits the *Mycobacterium tuberculosis* kinase/substrate pair PknH/EmbR." Biochem J **410**(2): 309-17.
- Monk, B. C. et A. Goffeau (2008). "Outwitting multidrug resistance to antifungals." Science **321**(5887): 367-9.
- Moody, J. E., L. Millen, D. Binns, J. F. Hunt et P. J. Thomas (2002). "Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters." J Biol Chem **277**(24): 21111-4.

- Morita, Y., A. Kataoka, S. Shiota, T. Mizushima et T. Tsuchiya (2000). "NorM of *Vibrio parahaemolyticus* Is an Na<sup>+</sup>-Driven Multidrug Efflux Pump." *J. Bacteriol.* **182**(23): 6694-6697.
- Moszer, I. (1998). "The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis." *FEBS Lett* **430**(1-2): 28-36.
- Moszer, I., P. Glaser et A. Danchin (1995). "SubtiList: a relational database for the *Bacillus subtilis* genome." *Microbiology* **141** ( Pt 2): 261-8.
- Moszer, I., L. M. Jones, S. Moreira, C. Fabry et A. Danchin (2002). "SubtiList: the reference database for the *Bacillus subtilis* genome." *Nucleic Acids Res* **30**(1): 62-5.
- Mourez, M., M. Hofnung et E. Dassa (1997). "Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits." *Embo J* **16**(11): 3066-77.
- Msadek, T. (1999). "When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*." *Trends Microbiol* **7**(5): 201-7.
- Müller, M., É. Bakos, E. Welker, A. Váradi, U. A. Germann, M. M. Gottesman, B. S. Morse, I. B. Roninson et B. Sarkadi (1996). "Altered Drug-stimulated ATPase Activity in Mutants of the Human Multidrug Resistance Protein." *J. Biol. Chem.* **271**(4): 1877-1883.
- Muneyuki, E., H. Noji, T. Amano, T. Masaike et M. Yoshida (2000). "F(0)F(1)-ATP synthase: general structural features of 'ATP-engine' and a problem on free energy transduction." *Biochim Biophys Acta* **1458**(2-3): 467-81.
- Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, T. Matsumoto et A. Yamaguchi (2006). "Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism." *Nature* **443**(7108): 173-9.
- Murata, M., S. Ohno, M. Kumano, K. Yamane et R. Ohki (2003). "Multidrug resistant phenotype of *Bacillus subtilis* spontaneous mutants isolated in the presence of puromycin and lincomycin." *Can J Microbiol* **49**(2): 71-7.
- Nanamiya, H., K. Kasai, A. Nozawa, C. S. Yun, T. Narisawa, K. Murakami, Y. Natori, F. Kawamura et Y. Tozawa (2008). "Identification and functional analysis of novel (p)ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*." *Mol Microbiol* **67**(2): 291-304.
- Newstead, S., H. Kim, G. von Heijne, S. Iwata et D. Drew (2007). "High-throughput fluorescent-based optimization of eukaryotic membrane protein overexpression and purification in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(35): 13936-41.
- Newton, A. C. (2003). "Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm." *Biochem J* **370**(Pt 2): 361-71.
- Neyfakh, A. A., V. E. Bidnenko et L. B. Chen (1991). "Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4781-5.
- Neyfakh, A. A. (1997). "Natural functions of bacterial multidrug transporters." *Trends Microbiol* **5**(8): 309-13.
- Neyfakh, A. A. (2002). "Mystery of multidrug transporters: the answer can be simple." *Mol Microbiol* **44**(5): 1123-30.
- Niederweis, M. (2003). "Mycobacterial porins--new channel proteins in unique outer membranes." *Mol Microbiol* **49**(5): 1167-77.



- Nikaido, K. et G. F. Ames (1999). "One intact ATP-binding subunit is sufficient to support ATP hydrolysis and translocation in an ABC transporter, the histidine permease." J Biol Chem **274**(38): 26727-35.
- Nishino, K. et A. Yamaguchi (2001). "Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*." J Bacteriol **183**(20): 5803-12.
- Noback, M. A., S. Holsappel, R. Kiewiet, P. Terpstra, R. Wambutt, H. Wedler, G. Venema et S. Bron (1998). "The 172 kb prkA-addAB region from 83 degrees to 97 degrees of the *Bacillus subtilis* chromosome contains several dysfunctional genes, the glyB marker, many genes encoding transporter proteins, and the ubiquitous hit gene." Microbiology **144** ( Pt 4): 859-75.
- Ochi, K., J. Kandala et E. Freese (1982). "Evidence that *Bacillus subtilis* sporulation induced by the stringent response is caused by the decrease in GTP or GDP." J. Bacteriol. **151**(2): 1062-1065.
- Ochi, K. et E. Freese (1983). "Effect of antibiotics on sporulation caused by the stringent response in *Bacillus subtilis*." J General Microbiol **129**(12): 3709-3720.
- Ochi, K. (2007). "From microbial differentiation to ribosome engineering." Biosci Biotechnol Biochem **71**(6): 1373-86.
- Ohki, R. et M. Murata (1997). "bmr3, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **179**(4): 1423-7.
- Ohki, R., K. Tateno, T. Takizawa, T. Aiso et M. Murata (2005). "Transcriptional Termination Control of a Novel ABC Transporter Gene Involved in Antibiotic Resistance in *Bacillus subtilis*." J. Bacteriol. **187**(17): 5946-5954.
- Oldham, M. L., D. Khare, F. A. Quijcho, A. L. Davidson et J. Chen (2007). "Crystal structure of a catalytic intermediate of the maltose transporter." Nature **450**(7169): 515-21.
- Olmsted, J., 3rd et D. R. Kearns (1977). "Mechanism of ethidium bromide fluorescence enhancement on binding to nucleic acids." Biochemistry **16**(16): 3647-54.
- Oppenheim, D. S. et C. Yanofsky (1980). "Translational coupling during expression of the tryptophan operon of *Escherichia coli*." Genetics **95**(4): 785-95.
- Orelle, C., O. Dalmás, P. Gros, A. Di Pietro et J. M. Jault (2003). "The conserved glutamate residue adjacent to the Walker-B motif is the catalytic base for ATP hydrolysis in the ATP-binding cassette transporter BmrA." J Biol Chem **278**(47): 47002-8.
- Orelle, C., T. Ayvaz, R. M. Everly, C. S. Klug et A. L. Davidson (2008a). "Both maltose-binding protein and ATP are required for nucleotide-binding domain closure in the intact maltose ABC transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12837-42.
- Orelle, C., F. Gubellini, A. Durand, S. Marco, D. Levy, P. Gros, A. Di Pietro et J. M. Jault (2008b). "Conformational change induced by ATP binding in the multidrug ATP-binding cassette transporter BmrA." Biochemistry **47**(8): 2404-12.
- Paik, S. H., A. Chakicherla et J. N. Hansen (1998). "Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168." J Biol Chem **273**(36): 23134-42.
- Park, S. T., C. M. Kang et R. N. Husson (2008). "Regulation of the SigH stress response regulon by an essential protein kinase in *Mycobacterium tuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13105-10.
- Parker, G. F., R. A. Daniel et J. Errington (1996). "Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*." Microbiology **142** (Pt 12): 3445-52.

- Pasca, M. R., P. Guglielame, F. Arcesi, M. Bellinzoni, E. De Rossi et G. Riccardi (2004). "Rv2686c-Rv2687c-Rv2688c, an ABC fluoroquinolone efflux pump in *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **48**(8): 3175-8.
- Pasca, M. R., P. Guglielame, E. De Rossi, F. Zara et G. Riccardi (2005). "mmpL7 gene of *Mycobacterium tuberculosis* is responsible for isoniazid efflux in *Mycobacterium smegmatis*." Antimicrob Agents Chemother **49**(11): 4775-7.
- Patzlaff, J. S., T. van der Heide et B. Poolman (2003). "The ATP/substrate stoichiometry of the ATP-binding cassette (ABC) transporter OpuA." J Biol Chem **278**(32): 29546-51.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown et R. A. Skurray (1996a). "Proton-dependent multidrug efflux systems." Microbiol Rev **60**(4): 575-608.
- Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, Jr., R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg et L. L. Grinius (1996b). "The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs." Mol Microbiol **19**(6): 1167-75.
- Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi et M. H. Saier, Jr. (1997). "A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria." FEMS Microbiol Lett **156**(1): 1-8.
- Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski et M. H. Saier, Jr. (1998). "Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities." J Mol Biol **277**(3): 573-92.
- Paulsen, I. T., J. Chen, K. E. Nelson et M. H. Saier, Jr. (2001). "Comparative genomics of microbial drug efflux systems." J Mol Microbiol Biotechnol **3**(2): 145-50.
- Paumi, C. M., M. Chuk, I. Chevelev, I. Stagljär et S. Michaelis (2008). "Negative regulation of the yeast ABC transporter Ycf1p by phosphorylation within its N-terminal extension." J Biol Chem **283**(40): 27079-88.
- Payen, L. F., M. Gao, C. J. Westlake, S. P. Cole et R. G. Deeley (2003). "Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1)." J Biol Chem **278**(40): 38537-47.
- Perego, M. (1998). "Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development." Trends Microbiol **6**(9): 366-70.
- Perez, E., S. Samper, Y. Bordas, C. Guilhot, B. Gicquel et C. Martin (2001). "An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence." Mol Microbiol **41**(1): 179-87.
- Perez, J., R. Garcia, H. Bach, J. H. de Waard, W. R. Jacobs, Jr., Y. Av-Gay, J. Bubis et H. E. Takiff (2006). "*Mycobacterium tuberculosis* transporter MmpL7 is a potential substrate for kinase PknD." Biochem Biophys Res Commun **348**(1): 6-12.
- Perria, C. L., V. Rajamanickam, P. E. Lapinski et M. Raghavan (2006). "Catalytic site modifications of TAP1 and TAP2 and their functional consequences." J Biol Chem **281**(52): 39839-51.
- Peterson, G. L. (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable." Anal Biochem **83**(2): 346-356.
- Peterson, J. D., L. A. Umayam, T. Dickinson, E. K. Hickey et O. White (2001). "The Comprehensive Microbial Resource." Nucleic Acids Res **29**(1): 123-5.
- Piddock, L. J. (2006). "Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance." Nat Rev Microbiol **4**(8): 629-36.

- Pinkett, H. W., A. T. Lee, P. Lum, K. P. Locher et D. C. Rees (2007). "An inward-facing conformation of a putative metal-chelate-type ABC transporter." Science **315**(5810): 373-7.
- Pittman, M. S., H. Corker, G. Wu, M. B. Binet, A. J. Moir et R. K. Poole (2002). "Cysteine is exported from the *Escherichia coli* cytoplasm by CydDC, an ATP-binding cassette-type transporter required for cytochrome assembly." J Biol Chem **277**(51): 49841-9.
- Pittman, M. S., H. C. Robinson et R. K. Poole (2005). "A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm." J Biol Chem **280**(37): 32254-61.
- Poelarends, G. J. et W. N. Konings (2002). "The transmembrane domains of the ABC multidrug transporter LmrA form a cytoplasmic exposed, aqueous chamber within the membrane." J Biol Chem **277**(45): 42891-8.
- Polgar, O. et S. E. Bates (2005). "ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance?" Biochem Soc Trans **33**(Pt 1): 241-5.
- Poole, K. (2005). "Efflux-mediated antimicrobial resistance." J Antimicrob Chemother **56**(1): 20-51.
- Poolman, B., M. K. Doeven, E. R. Geertsma, E. Biemans-Oldehinkel, W. N. Konings et D. C. Rees (2005). "Functional analysis of detergent-solubilized and membrane-reconstituted ATP-binding cassette transporters." Methods Enzymol **400**: 429-59.
- Portillo, A., F. Ruiz-Larrea, M. Zarazaga, A. Alonso, J. L. Martinez et C. Torres (2000). "Macrolide resistance genes in *Enterococcus spp.*" Antimicrob Agents Chemother **44**(4): 967-71.
- Pozza, A., J. M. Perez-Victoria, A. Sardo, A. Ahmed-Belkacem et A. Di Pietro (2006). "Purification of breast cancer resistance protein ABCG2 and role of arginine-482." Cell Mol Life Sci **63**(16): 1912-22.
- Procko, E., I. Ferrin-O'Connell, S. L. Ng et R. Gaudet (2006). "Distinct structural and functional properties of the ATPase sites in an asymmetric ABC transporter." Mol Cell **24**(1): 51-62.
- Procko, E. et R. Gaudet (2008). "Functionally important interactions between the nucleotide-binding domains of an antigenic peptide transporter." Biochemistry **47**(21): 5699-708.
- Pullman, M. E., H. S. Penefsky, A. Datta et E. Racker (1960). "Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase." J. Biol. Chem. **235**(11): 3322-3329.
- Putman, M., H. W. van Veen, J. E. Degener et W. E. Konings (2000a). "Antibiotic resistance: era of the multidrug pump." Molecular Microbiology **36**(3): 772-773.
- Putman, M., H. W. van Veen et W. N. Konings (2000b). "Molecular properties of bacterial multidrug transporters." Microbiol Mol Biol Rev **64**(4): 672-93.
- Qin, H., J. Hu, Y. Hua, S. V. Challa, T. A. Cross et F. P. Gao (2008). "Construction of a series of vectors for high throughput cloning and expression screening of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis*." BMC Biotechnol **8**: 51.
- Quentin, Y., G. Fichant et F. Denizot (1999). "Inventory, assembly and analysis of *Bacillus subtilis* ABC transport systems." J Mol Biol **287**(3): 467-84.
- Rafii, F. et M. Park (2008). "Detection and characterization of an ABC transporter in *Clostridium hathewayi*." Arch Microbiol **190**(4): 417-26.
- Raherison, S., P. Gonzalez, H. Renaudin, A. Charron, C. Bebear et C. M. Bebear (2005). "Increased expression of two multidrug transporter-like genes is associated with ethidium bromide and ciprofloxacin resistance in *Mycoplasma hominis*." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 421-4.

- Rais, I., M. Karas et H. Schagger (2004). "Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification." Proteomics **4**(9): 2567-71.
- Ramachandra, M., S. V. Ambudkar, D. Chen, C. A. Hrycyna, S. Dey, M. M. Gottesman et I. Pastan (1998). "Human P-glycoprotein exhibits reduced affinity for substrates during a catalytic transition state." Biochemistry **37**(14): 5010-9.
- Ramasarma, T., W. C. MacKellar et F. L. Crane (1981). "Vanadate-stimulated NADH oxidation in plasma membrane." Biochim Biophys Acta **646**(1): 88-98.
- Ramjeesingh, M., C. Li, E. Garami, L. J. Huan, K. Galley, Y. Wang et C. E. Bear (1999). "Walker mutations reveal loose relationship between catalytic and channel-gating activities of purified CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)." Biochemistry **38**(5): 1463-8.
- Ramon-Garcia, S., C. Martin, E. De Rossi et J. A. Ainsa (2007). "Contribution of the Rv2333c efflux pump (the Stp protein) from *Mycobacterium tuberculosis* to intrinsic antibiotic resistance in *Mycobacterium bovis* BCG." J Antimicrob Chemother **59**(3): 544-7.
- Ravaud, S., M. A. Do Cao, M. Jidenko, C. Ebel, M. Le Maire, J. M. Jault, A. Di Pietro, R. Haser et N. Aghajari (2006). "The ABC transporter BmrA from *Bacillus subtilis* is a functional dimer when in a detergent-solubilized state." Biochem J **395**(2): 345-53.
- Reinstein, J., I. Schlichting et A. Wittinghofer (1990). "Structurally and catalytically important residues in the phosphate binding loop of adenylate kinase of *Escherichia coli*." Biochemistry **29**(32): 7451-9.
- Ren, Q., K. H. Kang et I. T. Paulsen (2004). "TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D284-8.
- Reuter, G., T. Janvilisri, H. Venter, S. Shahi, L. Balakrishnan et H. W. van Veen (2003). "The ATP Binding Cassette Multidrug Transporter LmrA and Lipid Transporter MsbA Have Overlapping Substrate Specificities." J. Biol. Chem. **278**(37): 35193-35198.
- Reynolds, J. A. et C. Tanford (1970). "Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes." Proc Natl Acad Sci U S A **66**(3): 1002-7.
- Rhaese, H. J., H. Dichtelmuller et R. Grade (1975). "Studies on the control of development. Accumulation of guanosine tetraphosphate and pentaphosphate in response to inhibition of protein synthesis in *Bacillus subtilis*." Eur J Biochem **56**(2): 385-92.
- Rigaud, J. L., M. T. Paternostre et A. Bluzat (1988). "Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin." Biochemistry **27**(8): 2677-88.
- Rigaud, J. L., B. Pitard et D. Levy (1995). "Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins." Biochim Biophys Acta **1231**(3): 223-46.
- Rigaud, J. L., D. Levy, G. Mosser et O. Lambert (1998). "Detergent removal by non-polar polystyrene beads." Eur Biophysics J **27**(4): 305-319.
- Rigaud, J. L. et D. Levy (2003). "Reconstitution of membrane proteins into liposomes." Methods Enzymol **372**: 65-86.
- Riordan, J. R. et V. Ling (1979). "Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability." J Biol Chem **254**(24): 12701-5.

- Robertson, G. T., T. B. Doyle et A. S. Lynch (2005). "Use of an Efflux-Deficient *Streptococcus pneumoniae* Strain Panel To Identify ABC-Class Multidrug Transporters Involved in Intrinsic Resistance to Antimicrobial Agents." *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**(11): 4781-4783.
- Romsicki, Y. et F. J. Sharom (1998). "The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein--modulation by interaction with defined phospholipids." *Eur J Biochem* **256**(1): 170-8.
- Roosbeek, S., F. Peelman, A. Verhee, C. Labeur, H. Caster, M. F. Lensink, C. Cirulli, J. Grooten, C. Cochet, J. Vandekerckhove, A. Amoresano, G. Chimini, J. Tavernier et M. Rosseneu (2004). "Phosphorylation by Protein Kinase CK2 Modulates the Activity of the ATP Binding Cassette A1 Transporter." *J. Biol. Chem.* **279**(36): 37779-37788.
- Rosenberg, M. F., Q. Mao, A. Holzenburg, R. C. Ford, R. G. Deeley et S. P. C. Cole (2001a). "The Structure of the Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). Crystallization and single-particle analysis." *J. Biol. Chem.* **276**(19): 16076-16082.
- Rosenberg, M. F., G. Velarde, R. C. Ford, C. Martin, G. Berridge, I. D. Kerr, R. Callaghan, A. Schmidlin, C. Wooding, K. J. Linton et C. F. Higgins (2001b). "Repacking of the transmembrane domains of P-glycoprotein during the transport ATPase cycle." *Embo J* **20**(20): 5615-25.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg et J. C. Wootton (1990). "Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family." *Mol Microbiol* **4**(7): 1207-14.
- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove et S. Baumberg (1995). "Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact." *Gene* **153**(1): 93-8.
- Ruetz, S. et P. Gros (1994). "Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene." *Cell* **77**(7): 1071-81.
- Russell, D. G. (2007). "Who puts the tubercle in tuberculosis?" *Nat Rev Microbiol* **5**(1): 39-47.
- Sacchettini, J. C., E. J. Rubin et J. S. Freundlich (2008). "Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*." *Nat Rev Microbiol* **6**(1): 41-52.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer et J. Reizer (1994). "Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport." *Mol Microbiol* **11**(5): 841-7.
- Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray et H. Nikaido (1998a). "Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria." *Faseb J* **12**(3): 265-74.
- Saier, M. H., Jr., et R. K. Poole (1998b). Molecular Phylogeny as a Basis for the Classification of Transport Proteins from Bacteria, Archaea and Eukarya. *Advances in Microbial Physiology*, Academic Press. **40**: 81-136.
- Sakamoto, K., A. Margolles, H. W. van Veen et W. N. Konings (2001). "Hop Resistance in the Beer Spoilage Bacterium *Lactobacillus brevis* Is Mediated by the ATP-Binding Cassette Multidrug Transporter *HorA*." *J. Bacteriol.* **183**(18): 5371-5375.
- Sander, P., E. De Rossi, B. Boddington, R. Cantoni, M. Branzoni, E. C. Bottger, H. Takiff, R. Rodriguez, G. Lopez et G. Riccardi (2000). "Contribution of the multidrug efflux pump *LfrA* to innate mycobacterial drug resistance." *FEMS Microbiol Lett* **193**(1): 19-23.
- Sands, M. K. et R. B. Roberts (1952). "The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **63**(4): 505-11.

- Saraste, M., P. R. Sibbald et A. Wittinghofer (1990). "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **15**(11): 430-4.
- Sauna, Z. E. et S. V. Ambudkar (2000). "Evidence for a requirement for ATP hydrolysis at two distinct steps during a single turnover of the catalytic cycle of human P-glycoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2515-20.
- Sauna, Z. E. et S. V. Ambudkar (2001). "Characterization of the catalytic cycle of ATP hydrolysis by human P-glycoprotein. The two ATP hydrolysis events in a single catalytic cycle are kinetically similar but affect different functional outcomes." J Biol Chem **276**(15): 11653-61.
- Saurin, W., M. Hofnung et E. Dassa (1999). "Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters." J Mol Evol **48**(1): 22-41.
- Schinkel, A. H., C. A. A. M. Mol, E. Wagenaar, L. van Deemter, J. J. M. Smit et P. Borst (1995). "Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice." Eur J of Cancer **31**(7-8): 1295-1298.
- Schmitt, L., H. Benabdelhak, M. A. Blight, I. B. Holland et M. T. Stubbs (2003). "Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains." J Mol Biol **330**(2): 333-42.
- Schneider, E. et S. Hunke (1998). "ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains." FEMS Microbiol Rev **22**(1): 1-20.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray et R. G. Brennan (2001). "Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition." Science **294**(5549): 2158-63.
- Schumacher, M. A., M. C. Miller et R. G. Brennan (2004). "Structural mechanism of the simultaneous binding of two drugs to a multidrug-binding protein." Embo J **23**(15): 2923-30.
- Schumperli, D., K. McKenney, D. A. Sobieski et M. Rosenberg (1982). "Translational coupling at an intercistronic boundary of the *Escherichia coli* galactose operon." Cell **30**(3): 865-71.
- Schweins, T., M. Geyer, K. Scheffzek, A. Warshel, H. R. Kalbitzer et A. Wittinghofer (1995). "Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins." Nat Struct Biol **2**(1): 36-44.
- See, R. H., R. A. Caday-Malcolm, R. R. Singaraja, S. Zhou, A. Silverston, M. T. Huber, J. Moran, E. R. James, R. Janoo, J. M. Savill, V. Rigot, L.-H. Zhang, M. Wang, G. Chimini, C. L. Wellington, S. R. Tafuri et M. R. Hayden (2002). "Protein Kinase A Site-specific Phosphorylation Regulates ATP-binding Cassette A1 (ABCA1)-mediated Phospholipid Efflux." J. Biol. Chem. **277**(44): 41835-41842.
- Senior, A. E., S. Wilke-Mounts et M. K. al-Shawi (1993). "Lysine 155 in beta-subunit is a catalytic residue of *Escherichia coli* F1 ATPase." J Biol Chem **268**(10): 6989-94.
- Senior, A. E., M. K. al-Shawi et I. L. Urbatsch (1995). "The catalytic cycle of P-glycoprotein." FEBS Lett **377**(3): 285-9.
- Shapiro, A. B. et V. Ling (1995). "Reconstitution of Drug Transport by Purified P-glycoprotein." J. Biol. Chem. **270**(27): 16167-16175.
- Shapiro, A. B., A. B. Corder et V. Ling (1997a). "P-glycoprotein-mediated Hoechst 33342 transport out of the lipid bilayer." Eur J Biochem **250**(1): 115-21.

- Shapiro, A. B. et V. Ling (1997b). "Positively Cooperative Sites for Drug Transport by P-Glycoprotein with Distinct Drug Specificities." Eur J of Biochem **250**(1): 130-137.
- Shi, L., M. Potts et P. J. Kennelly (1998). "The serine, threonine, and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait." FEMS Microbiol Rev **22**(4): 229-53.
- Shi, Y., Z. Wu, N. Cui, W. Shi, Y. Yang, X. Zhang, A. Rojas, B. T. Ha et C. Jiang (2007). "PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular KATP channel activation by beta-adrenergic receptors." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(3): R1205-1214.
- Shi, Y., X. Chen, Z. Wu, W. Shi, Y. Yang, N. Cui, C. Jiang et R. W. Harrison (2008a). "cAMP-dependent Protein Kinase Phosphorylation Produces Interdomain Movement in SUR2B Leading to Activation of the Vascular KATP Channel." J. Biol. Chem. **283**(12): 7523-7530.
- Shi, X., S. Wegener-Feldbrugge, S. Huntley, N. Hamann, R. Hedderich et L. Sogaard-Andersen (2008b). "Bioinformatics and experimental analysis of proteins of two-component systems in *Myxococcus xanthus*." J Bacteriol **190**(2): 613-24.
- Shukla, S., V. Rai, D. Banerjee et R. Prasad (2006). "Characterization of Cdr1p, a major multidrug efflux protein of *Candida albicans*: purified protein is amenable to intrinsic fluorescence analysis." Biochemistry **45**(7): 2425-35.
- Shukla, S., V. Rai, P. Saini, D. Banerjee, A. K. Menon et R. Prasad (2007). "Candida drug resistance protein 1, a major multidrug ATP binding cassette transporter of *Candida albicans*, translocates fluorescent phospholipids in a reconstituted system." Biochemistry **46**(43): 12081-90.
- Shyamala, V., V. Baichwal, E. Beall et G. F. Ames (1991). "Structure-function analysis of the histidine permease and comparison with cystic fibrosis mutations." J. Biol. Chem. **266**(28): 18714-18719.
- Siddiqi, N., R. Das, N. Pathak, S. Banerjee, N. Ahmed, V. M. Katoch et S. E. Hasnain (2004). "*Mycobacterium tuberculosis* isolate with a distinct genomic identity overexpresses a tap-like efflux pump." Infection **32**(2): 109-11.
- Silva, P. E., F. Bigi, M. P. Santangelo, M. I. Romano, C. Martin, A. Cataldi et J. A. Ainsa (2001). "Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **45**(3): 800-4.
- Singh, K. V., G. M. Weinstock et B. E. Murray (2002). "An *Enterococcus faecalis* ABC homologue (Lsa) is required for the resistance of this species to clindamycin and quinupristin-dalfopristin." Antimicrob Agents Chemother **46**(6): 1845-50.
- Siroy, A., V. Molle, C. Lemaitre-Guillier, D. Vallenet, M. Pestel-Caron, A. J. Cozzzone, T. Jouenne et E. De (2005). "Channel Formation by CarO, the Carbapenem Resistance-Associated Outer Membrane Protein of *Acinetobacter baumannii*." Antimicrob. Agents Chemother. **49**(12): 4876-4883.
- Siroy, A., C. Mailaender, D. Harder, S. Koerber, F. Wolschendorf, O. Danilchanka, Y. Wang, C. Heinz et M. Niederweis (2008). "Rv1698 of *Mycobacterium tuberculosis* Represents a New Class of Channel-forming Outer Membrane Proteins." J. Biol. Chem. **283**(26): 17827-17837.
- Smith, C. A. et I. Rayment (1996). "Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins." Biophys J **70**(4): 1590-602.
- Smith, P. C., N. Karpowich, L. Millen, J. E. Moody, J. Rosen, P. J. Thomas et J. F. Hunt (2002). "ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer." Mol Cell **10**(1): 139-49.

- Sorensen, H. P. et K. K. Mortensen (2005). "Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." J Biotechnol **115**(2): 113-28.
- Sreevatsan, S., X. Pan, K. E. Stockbauer, N. D. Connell, B. N. Kreiswirth, T. S. Whittam et J. M. Musser (1997). "Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9869-74.
- Stankiewicz, P. J., A. S. Tracey et D. C. Crans (1995). "Inhibition of phosphate-metabolizing enzymes by oxovanadium(V) complexes." Met Ions Biol Syst **31**: 287-324.
- Stein, M., J. Dittgen, C. Sanchez-Rodriguez, B.-H. Hou, A. Molina, P. Schulze-Lefert, V. Lipka et S. Somerville (2006). "Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration." Plant Cell **18**(3): 731-746.
- Steinfels, E., C. Orelle, J. R. Fantino, O. Dalmas, J. L. Rigaud, F. Denizot, A. DiPietro et J. M. Jault (2004). "Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus subtilis*." Biochemistry **43**(23): 7491-7502.
- Steinfels, E., C. Orelle, O. Dalmas, F. Penin, B. Miroux, A. Di Pietro et J. M. Jault (2002). "Highly efficient over-production in *E. coli* of YvcC, a multidrug-like ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*." Biochim Biophys Acta **1565**(1): 1-5.
- Stock, A. M., V. L. Robinson et P. N. Goudreau (2000). "Two-component signal transduction." Annu Rev Biochem **69**: 183-215.
- Strop, P. et A. T. Brunger (2005). "Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins." Protein Sci **14**(8): 2207-11.
- Szabo, K., E. Bakos, E. Welker, M. Muller, H. R. Goodfellow, C. F. Higgins, A. Varadi et B. Sarkadi (1997). "Phosphorylation Site Mutations in the Human Multidrug Transporter Modulate Its Drug-stimulated ATPase Activity." J. Biol. Chem. **272**(37): 23165-23171.
- Szabo, K., G. Szakacs, T. Hegedus et B. Sarkadi (1999). "Nucleotide Occlusion in the Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. Different patterns in the two nucleotide binding domains." J. Biol. Chem. **274**(18): 12209-12212.
- Takayama, K., C. Wang et G. S. Besra (2005). "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*." Clin Microbiol Rev **18**(1): 81-101.
- Takiff, H. E., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom et W. R. Jacobs, Jr. (1996). "Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 362-6.
- Tamae, C., A. Liu, K. Kim, D. Sitz, J. Hong, E. Becket, A. Bui, P. Solaimani, K. P. Tran, H. Yang et J. H. Miller (2008). "Determination of antibiotic hypersensitivity among 4,000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*." J Bacteriol **190**(17): 5981-8.
- Tew, K. D. et Z. Ronai (1999). "GST function in drug and stress response." Drug Resist Updat **2**(3): 143-147.
- Thakur, J. K., H. Arthanari, F. Yang, S. J. Pan, X. Fan, J. Breger, D. P. Frueh, K. Gulshan, D. K. Li, E. Mylonakis, K. Struhl, W. S. Moye-Rowley, B. P. Cormack, G. Wagner et A. M. Naar (2008a). "A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi." Nature **452**(7187): 604-9.



- Thakur, M. et P. K. Chakraborti (2008b). "Ability of PknA, a mycobacterial eukaryotic-type serine/threonine kinase to transphosphorylate MurD, a ligase involved in the process of peptidoglycan biosynthesis." Biochem J **415**(1): 27-33.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins et T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Tokuda, H. et S. Matsuyama (2004). "Sorting of lipoproteins to the outer membrane in *E. coli*." Biochim Biophys Acta **1693**(1): 5-13.
- Tomii, K. et M. Kanehisa (1998). "A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes." Genome Res **8**(10): 1048-59.
- Trompier, D., M. Alibert, S. Davanture, Y. Hamon, M. Pierres et G. Chimini (2006). "Transition from Dimers to Higher Oligomeric Forms Occurs during the ATPase Cycle of the ABCA1 Transporter." J. Biol. Chem. **281**(29): 20283-20290.
- Tsuge, K., Y. Ohata et M. Shoda (2001). "Gene yerP, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*." Antimicrob Agents Chemother **45**(12): 3566-73.
- Turner, M. S. et J. D. Helmann (2000). "Mutations in multidrug efflux homologs, sugar isomerases, and antimicrobial biosynthesis genes differentially elevate activity of the sigma(X) and sigma(W) factors in *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **182**(18): 5202-10.
- Tzeng, Y. L. et J. A. Hoch (1997). "Molecular recognition in signal transduction: the interaction surfaces of the Spo0F response regulator with its cognate phosphorelay proteins revealed by alanine scanning mutagenesis." J Mol Biol **272**(2): 200-12.
- Ubarretxena-Belandia, I., J. M. Baldwin, S. Schuldiner et C. G. Tate (2003). "Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer." Embo J **22**(23): 6175-81.
- Ueda, K., N. Inagaki et S. Seino (1997). "MgADP Antagonism to Mg<sup>2+</sup>-independent ATP Binding of the Sulfonylurea Receptor SUR1." J. Biol. Chem. **272**(37): 22983-22986.
- Uicker, W. C., L. Schaefer et R. A. Britton (2006). "The essential GTPase RbgA (YlqF) is required for 50S ribosome assembly in *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **59**(2): 528-40.
- Urban, A., S. Eckermann, B. Fast, S. Metzger, M. Gehling, K. Ziegelbauer, H. Rubsamen-Waigmann et C. Freiberg (2007). "Novel whole-cell antibiotic biosensors for compound discovery." Appl Environ Microbiol **73**(20): 6436-43.
- Urbani, A. et T. Warne (2005). "A colorimetric determination for glycosidic and bile salt-based detergents: applications in membrane protein research." Anal Biochem **336**(1): 117-24.
- Urbatsch, I. L., M. Julien, I. Carrier, M. E. Rousseau, R. Cayrol et P. Gros (2000). "Mutational analysis of conserved carboxylate residues in the nucleotide binding sites of P-glycoprotein." Biochemistry **39**(46): 14138-49.
- Van Bambeke, F., E. Balzi et P. M. Tulkens (2000). "Antibiotic efflux pumps." Biochem Pharmacol **60**(4): 457-70.
- Van Bambeke, F., R. R. Reinert, P. C. Appelbaum, P. M. Tulkens et W. E. Peetermans (2007). "Multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* infections: current and future therapeutic options." Drugs **67**(16): 2355-82.
- van Helvoort, A., A. J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A. H. Schinkel, P. Borst et G. van Meer (1996). "MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine." Cell **87**(3): 507-17.

- van Veen, H. W., K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. Driessen et W. N. Konings (1996). "Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10668-72.
- van Veen, H. W., C. F. Higgins et W. N. Konings (2001). "Multidrug transport by ATP binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine mechanism." Res Microbiol **152**(3-4): 365-74.
- Van Veldhoven, P. P. et G. P. Mannaerts (1987). "Inorganic and organic phosphate measurements in the nanomolar range." Anal Biochem **161**(1): 45-8.
- VanAken, T., S. Foxall-VanAken, S. Castleman et S. Ferguson-Miller (1986). "Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins." Methods Enzymol **125**: 27-35.
- Velamakanni, S., Y. Yao, D. A. Gutmann et H. W. van Veen (2008). "Multidrug Transport by the ABC Transporter Sav1866 from *Staphylococcus aureus*." Biochemistry **47**(35): 9300-8.
- Vellanoweth, R. L. et J. C. Rabinowitz (1992). "The influence of ribosome-binding-site elements on translational efficiency in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* in vivo." Mol Microbiol **6**(9): 1105-14.
- Vetter, I. R. et A. Wittinghofer (1999). "Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer." Q Rev Biophys **32**(1): 1-56.
- Vigano, C., V. Grimard, A. Margolles, E. Goormaghtigh, H. W. van Veen, W. N. Konings et J.-M. Ruyschaert (2002). "A new experimental approach to detect long-range conformational changes transmitted between the membrane and cytosolic domains of LmrA, a bacterial multidrug transporter." FEBS Letters **530**(1-3): 197-203.
- Vijaya, S., F. L. Crane et T. Ramasarma (1984). "A vanadate-stimulated NADH oxidase in erythrocyte membrane generates hydrogen peroxide." Mol Cell Biochem **62**(2): 175-85.
- Villarino, A., R. Duran, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England, P. Brodin, S. T. Cole, U. Zimny-Arndt, P. R. Jungblut, C. Cervenansky et P. M. Alzari (2005). "Proteomic identification of M. tuberculosis protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions." J Mol Biol **350**(5): 953-63.
- Vyskocil, F., J. Teisinger et H. Dlouha (1980). "A specific enzyme is not necessary for vanadate-induced oxidation of NADH." Nature **286**(5772): 516-7.
- Waddell, S. J., R. A. Stabler, K. Laing, L. Kremer, R. C. Reynolds et G. S. Besra (2004). "The use of microarray analysis to determine the gene expression profiles of *Mycobacterium tuberculosis* in response to anti-bacterial compounds." Tuberculosis (Edinb) **84**(3-4): 263-74.
- Wade, M. M. et Y. Zhang (2004). "Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." Front Biosci **9**: 975-94.
- Wagner, S., L. Baars, A. J. Ytterberg, A. Klussmeier, C. S. Wagner, O. Nord, P.-A. Nygren, K. J. van Wijk et J.-W. de Gier (2007). "Consequences of Membrane Protein Overexpression in *Escherichia coli*." Mol Cell Proteomics **6**(9): 1527-1550.
- Wagner, S., M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson et J. W. de Gier (2008). "Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(38): 14371-6.
- Walker, J. E., M. Saraste, M. J. Runswick et N. J. Gay (1982). "Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold." Embo J **1**(8): 945-51.

- Wang, Z., L. D. Stalcup, B. J. Harvey, J. Weber, M. Chloupkova, M. E. Dumont, M. Dean et I. L. Urbatsch (2006). "Purification and ATP hydrolysis of the putative cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8." Biochemistry **45**(32): 9929-39.
- Wang, J. D., G. M. Sanders et A. D. Grossman (2007). "Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp." Cell **128**(5): 865-75.
- Ward, A., C. L. Reyes, J. Yu, C. B. Roth et G. Chang (2007). "Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(48): 19005-10.
- Weiner, J. H., B. D. Lemire, M. L. Elmes, R. D. Bradley et D. G. Scraba (1984). "Overproduction of fumarate reductase in *Escherichia coli* induces a novel intracellular lipid-protein organelle." J. Bacteriol. **158**(2): 590-596.
- Wesolowska, O., D. Mosiadz, N. Motohashi, M. Kawase et K. Michalak (2005). "Phenothiazine maleates stimulate MRP1 transport activity in human erythrocytes." Biochim Biophys Acta **1720**(1-2): 52-8.
- White, M. A., K. M. Clark, E. J. Grayhack et M. E. Dumont (2007). "Characteristics affecting expression and solubilization of yeast membrane proteins." J Mol Biol **365**(3): 621-36.
- Whitehead, G. B. (1959). "Pyrethrum resistance conferred by resistance to DDT in the blue tick." Nature **184**(Suppl 6): 378-9.
- Whitney, C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, C. Lexau, A. Reingold, L. Lefkowitz, P. R. Cieslak, M. Cetron, E. R. Zell, J. H. Jorgensen et A. Schuchat (2000). "Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States." N Engl J Med **343**(26): 1917-24.
- Wiegert, T., G. Homuth, S. Versteeg et W. Schumann (2001). "Alkaline shock induces the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon." Mol Microbiol **41**(1): 59-71.
- Winstedt, L., K. Yoshida, Y. Fujita et C. von Wachenfeldt (1998). "Cytochrome bd biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the cydABCD operon." J Bacteriol **180**(24): 6571-80.
- Woecking, B., G. Reuter, R. A. Shilling, S. Velamakanni, S. Shahi, H. Venter, L. Balakrishnan et H. W. van Veen (2005). "Drug-Lipid A Interactions on the *Escherichia coli* ABC Transporter MsbA." J. Bacteriol. **187**(18): 6363-6369.
- Woolridge, D. P., N. Vazquez-Laslop, P. N. Markham, M. S. Chevalier, E. W. Gerner et A. A. Neyfakh (1997). "Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Blt." J Biol Chem **272**(14): 8864-6.
- Wu, X., H. Jornvall, K. D. Berndt et U. Oppermann (2004). "Codon optimization reveals critical factors for high level expression of two rare codon genes in *Escherichia coli*: RNA stability and secondary structure but not tRNA abundance." Biochem Biophys Res Commun **313**(1): 89-96.
- Xie, Y., K. Xu, D. E. Linn, X. Yang, Z. Guo, H. Shimelis, T. Nakanishi, D. D. Ross, H. Chen, L. Fazli, M. E. Gleave et Y. Qiu (2008). "The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells." J Biol Chem **283**(6): 3349-56.
- Xu, J., Y. Liu, Y. Yang, S. Bates et J.-T. Zhang (2004). "Characterization of Oligomeric Human Half-ABC Transporter ATP-binding Cassette G2." J. Biol. Chem. **279**(19): 19781-19789.
- Yang, R., A. McBride, Y. X. Hou, A. Goldberg et X. B. Chang (2005). "Nucleotide dissociation from NBD1 promotes solute transport by MRP1." Biochim Biophys Acta **1668**(2): 248-61.

- Yang, Y., Y. Liu, Z. Dong, J. Xu, H. Peng, Z. Liu et J.-T. Zhang (2007). "Regulation of Function by Dimerization through the Amino-terminal Membrane-spanning Domain of Human ABCC1/MRP1." J. Biol. Chem. **282**(12): 8821-8830.
- Yanofsky, C. (2001). "Advancing our knowledge in biochemistry, genetics, and microbiology through studies on tryptophan metabolism." Annu Rev Biochem **70**(1): 1-37.
- Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto et S. Ishii (1995). "Increase of Solubility of Foreign Proteins in *Escherichia coli* by Coproduction of the Bacterial Thioredoxin." J. Biol. Chem. **270**(43): 25328-25331.
- Yates, J. L. et M. Nomura (1981). "Feedback regulation of ribosomal protein synthesis in *E. coli*: localization of the mRNA target sites for repressor action of ribosomal protein L1." Cell **24**(1): 243-9.
- Yeats, C., R. D. Finn et A. Bateman (2002). "The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain." Trends Biochem Sci **27**(9): 438.
- Yin, Y., X. He, P. Szewczyk, T. Nguyen et G. Chang (2006). "Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*." Science **312**(5774): 741-4.
- Yokota, T. (1996). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in Japan: Its prophylaxis and treatment based on the mechanisms." J Infect Chemother **2**(1): 1-7.
- Yokoyama, K., Y. Kikuchi et H. Yasueda (1998). "Overproduction of DnaJ in *Escherichia coli* improves in vivo solubility of the recombinant fish-derived transglutaminase." Biosci Biotechnol Biochem **62**(6): 1205-10.
- Yoshida, H., M. Bogaki, S. Nakamura, K. Ubukata et M. Konno (1990). "Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones." J Bacteriol **172**(12): 6942-9.
- Zaitseva, J., S. Jenewein, T. Jumpertz, I. B. Holland et L. Schmitt (2005a). "H662 is the linchpin of ATP hydrolysis in the nucleotide-binding domain of the ABC transporter HlyB." Embo J **24**(11): 1901-10.
- Zaitseva, J., S. Jenewein, A. Wiedenmann, H. Benabdelhak, I. B. Holland et L. Schmitt (2005b). "Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter." Biochemistry **44**(28): 9680-90.
- Zhang, D. W., G. A. Graf, R. D. Gerard, J. C. Cohen et H. H. Hobbs (2006). "Functional asymmetry of nucleotide-binding domains in ABCG5 and ABCG8." J Biol Chem **281**(7): 4507-16.
- Zhang, Z., C. Ma, O. Pornillos, X. Xiu, G. Chang et M. H. Saier, Jr. (2007). "Functional characterization of the heterooligomeric EbrAB multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis*." Biochemistry **46**(17): 5218-25.
- Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh et R. G. Brennan (1999). "Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter." Cell **96**(3): 353-62.
- Zheng, X., K. G. Papavinasasundaram et Y. Av-Gay (2007). "Novel substrates of *Mycobacterium tuberculosis* PknH Ser/Thr kinase." Biochem Biophys Res Commun **355**(1): 162-8.
- Zubay, G. (1973). "In Vitro Synthesis of Protein in Microbial Systems." Annu Rev Genet **7**(1): 267-287.

## COMMUNICATIONS A DES CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

1. "Yhel/YheH: a new heterodimeric ABC transporter from *Bacillus subtilis*." TORRES C., GALIAN C., FANTINO J.-R., DENIZOT F. et JAULT J.-M.. **Gordon Conference on Multi-Drug Efflux Systems, Oxford, Angleterre**, 28 Août - 2 Septembre 2005
2. "A new multidrug ABC transporter from *Bacillus subtilis*: the heterodimer Yhel/YheH." TORRES C., GALIAN C., FANTINO J.-R., DENIZOT F. et JAULT J.-M.. **4<sup>ème</sup> Colloque ABC Franco-Belge, Paris, France**, 6 Octobre 2006
3. "A new multidrug ABC transporter from *Bacillus subtilis*: the heterodimer Yhel/YheH." GALIAN C., TORRES C. et JAULT J.-M.. **GDR 2478 « Protéines Membranaires : Propriétés moléculaires dans les environnements amphiphiles » 2<sup>ème</sup> réunion plénière, Guitté, France**, 4 - 8 Juin 2007
4. "A new multidrug ABC transporter from *Bacillus subtilis*: the heterodimer Yhel/YheH." GALIAN C., TORRES C., FANTINO J.-R., DENIZOT F. et JAULT J.-M.. **Congrès du Groupe Français de Bioénergétique, Ile d'Oléron, France**, 21 - 24 Juin 2007
5. "Challenges in purification and stabilization of the heterodimer Yhel/YheH, an ABC transporter from *Bacillus subtilis*." GALIAN C., TORRES C., LEVY D. et JAULT J.-M.. **5<sup>ème</sup> Colloque ABC Franco-Belge, Paris, France**, 9 Octobre 2007
6. "A new multidrug ABC transporter from *Bacillus subtilis*: the heterodimer Yhel/YheH." GALIAN C., TORRES C., FREIBERG C. et JAULT J.-M.. **2<sup>nd</sup> FEBS Special Meeting : ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, Innsbruck, Autriche**, 1 - 8 Mars 2008
7. "Challenges in purification and stabilization of the heterodimer Yhel/YheH, a new multidrug ABC transporter from *Bacillus subtilis*." GALIAN C., TORRES C., LEVY D. et JAULT J.-M.. **GDR 2478 « Protéines Membranaires : Propriétés moléculaires dans les environnements amphiphiles » 3<sup>ème</sup> réunion plénière, Praz-sur-Arly, France**, 25 - 29 Mars 2008

## PUBLICATIONS

1. "The *Bacillus subtilis* Yhel/YheH heterodimer is a multidrug ABC transporter." Cristina TORRES\*, Carmen GALIÁN\*, Christoph FREIBERG & Jean-Michel JAULT (2009). Biochim Biophys Acta **1788**(3): 615-22.
2. "Functional purification and reconstitution of a bacterial multidrug ABC heterodimer." Carmen GALIÁN, Florence MANON, Cristina TORRES, Christine EBEL, Daniel LEVY & Jean-Michel JAULT. *En préparation*